

A Tks4 állványfehérje funkcionális vizsgálata

Doktori Értekezés

Dülk Metta

okleveles biomérnök

ELTE Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program

Iskolavezető: Dr. Erdei Anna

Programvezető: Dr. Kovács Mihály

Témavezető: Dr. Buday László



Budapest, 2019

Tartalomjegyzék

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
2	BEVEZETÉS	2
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
3.1	Állványfehérjék.....	3
3.2	A Tks4 állványfehérje szerkezete	5
3.3	A Tks4 állványfehérje élettani szerepe.....	10
3.4	Frank-ter Haar szindróma	16
3.5	Mesenchymalis őssejtek (MSC-k).....	19
3.6	Az EGF jelátviteli útvonal jellemzői.....	23
3.7	Src tirozin kináz.....	28
4	CÉLKITŰZÉS	32
5	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	33
5.1	Tks4-hiányos egér előállítása	33
5.2	Csontvelői MSC kultúrák előállítása és karakterizálása	33
5.3	Zsír és csont irányú differenciáció.....	34
5.4	RNS izolálás, gén expressziós analízis.....	35
5.5	Pozitronemissziós tomográfia/mágneses magrezonancia képalkotás (PET/MRI)	35
5.6	A Tks4 bioinformatikai analízise.....	35
5.7	Plazmidok és konstrukciók, irányított mutagenézis.....	36
5.8	Fehérje termelés és tisztítás.....	36
5.9	Foszforiláció.....	37
5.10	COS7 sejtek fenntartása, transzfekciója és EGF stimulációja	37
5.11	Ellenanyagok	38
5.12	Immunprecipitáció és western blot	38
5.13	Immunfluoreszcens festés	39
5.14	Proximitás ligációs vizsgálat.....	39
5.15	GST interakciós kísérletek	40
5.16	Fluoreszcencia polarizációs kísérletek.....	41
6	EREDMÉNYEK.....	42
6.1	Az Tks4-hiányos egerek jellemzése	42
6.2	A Tks4-hiányos egerekből származó csontvelői MSC-k karakterizálása.....	44
6.3	A Tks4 hatása a csontvelői MSC-k csont és zsír irányú differenciációjára.....	46
6.4	A Tks4 szekvencia analízise és a potenciális Src-kötő motívumok.....	50
6.5	A Tks4 és az Src közötti kapcsolat szerkezeti háttere	52
6.6	Az EGF-stimuláció hatására kialakuló Tks4-Src interakció vizsgálata COS7 sejtekben.....	59

7	DISZKUSSZIÓ.....	63
8	ÖSSZEFOGLALÁS.....	70
9	ABSTRACT.....	71
10	MELLÉKLETEK.....	72
11	IRODALOMJEGYZÉK.....	76
12	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	97
13	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	98

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADM	Adipogenic differentiation medium
BDCS	Borrone-dermato-cardio-skeletal syndrome
CM	Complete medium
DMEM	Dulbbelco's Modified Eagle Medium
DPLA/PLA	Duolink proximity ligation assay/Proximity ligation assay
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ESC	Embryonic stem cell
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
FP	Fluorescence polarization
FTHS	Frank-Ter Haar syndrome
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
KO	Knock out
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MSC	Mesenchymal stem/stromal cells
ODM	Osteogenic differentiation medium
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI(3)P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PRR	Proline-rich region
PX	Phox homology domain
ROS	Reactive oxygen species
SH3	Src homology 3 domain
Tks4	Tyrosine kinase substrate with 4 SH3 domains
Tks5	Tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains
WT	Wild type

2 BEVEZETÉS

Az állványfehérjék a jelátviteli útvonalak fontos szereplői, ugyanis lehetővé teszik a szignalizációban részt vevő komponensek megfelelő közelségbe kerülését, lokális koncentrációjuk megemelkedését, ezáltal megteremtve a szükséges kapcsolatot közöttük. Ilyen állványfehérje a Tks családba tartozó Tks4 (tyrosine kinase substrate with four Src homology 3 domains) is, amely szerkezetét tekintve egy PX (phox homology) domént, 4 négy SH3 (Src homology 3) domént és több prolinban gazdag régiót (PRR, proline-rich region) tartalmaz. A PX domén a lipiddkötés, illetve a membrán-lokalizáció szempontjából fontos, míg az SH3 domének és a prolinban gazdag szekvenciák a fehérje-fehérje közötti interakció kialakulásáért felelősek. A Tks4 fontos szerepet játszik a podoszómák, invadopódiumok létrehozásában [1], a reaktív oxigén származékok homeosztázisában [2], [3], részt vesz az EGF jelpályában [4], valamint hiányához köthető a Frank-ter Haar szindróma (FTHS) kialakulása [5]. Az FTHS egy autoszomális recesszív rendellenesség, amelynek következményei közé tartoznak többek közt csontfejlődési és koponya rendellenességek, szív- és érrendszeri zavarok, valamint csökkent mennyiségű zsírszövet.

Jelenleg még nem ismert, hogy a Tks4 hiányában milyen folyamatok sérülnek, amely hatására kialakul a betegsége jellemző tünetegyüttes. A szövetek egészséges fejlődéséhez egyebek mellett a mesenchymalis őssejtek is hozzájárulnak. A mesenchymalis ő- vagy stroma sejtek (röviden MSC-k) olyan multipotens szöveti őssejtek, amelyek az egész szervezetben fellelhetőek és fontos szerepet játszanak több szerv/szövet önfenntartásában és regenerációjában, de hatással vannak a vérképzésre és az immunválasz folyamataira is [6]. Ezek a sejtek a megfelelő induktorok jelenlétében képesek zsír-, csont- és porcszövet irányába differenciálódni [7]. Az előbbi alapján érdekes kérdés, hogy az FTHS-el járó fenotípust mennyire befolyásolják az MSC-k.

A jelátviteli folyamatok közül az EGF útvonal esetében már bizonyított, hogy magába foglalja a Tks4-et, bár ebben az állványfehérje pontos szerepe még nem ismert. Az EGFR számos jelátviteli útvonalon keresztül szabályozhatja például a sejtosztódást, a differenciációt, a sejtek túlélését vagy az aktin sejtváza átrendeződését [8]. Az Src tirozin kináz is az EGF jelátvitel egyik fő komponense, valamint az EGF stimulációt követően komplexet képez az EGFR-el és Tks4-el [4]. Ennek az interakciónak a megfejtésével közelebb kerülhetünk annak megértéséhez, hogy a Tks4 miként vesz részt ebben a szignalizációban.

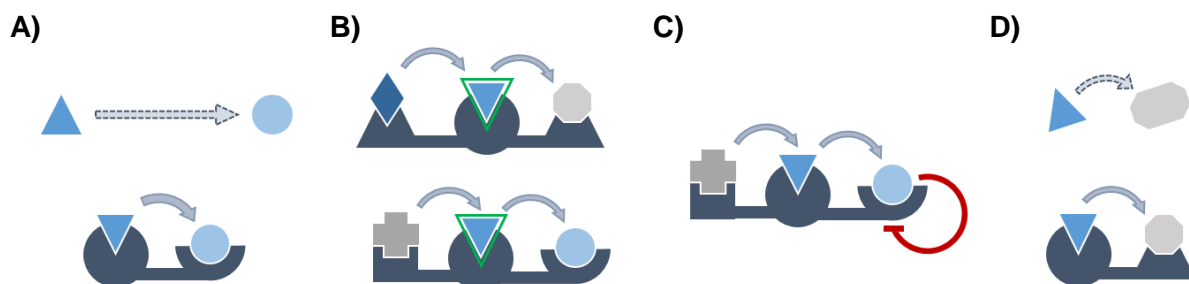
3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Állványfehérjék

Az állványfehérjéket évekkel ezelőtt véletlenül fedezték fel, miközben néhány jól ismert jelátviteli enzim vagy receptor funkcióját és fontosságát tanulmányozták [9]. Korábban ezeket a fehérjéket a jelátviteli útvonalak passzív komponenseinek tekintették, azonban ez a nézőpont fokozatosan változott, mivel egyre több állványfehérjéről derült ki, hogy inkább aktív szabályozó szerepük van. Az állványfehérjék fontos sajátossága, hogy jelátviteli komplexeket hoznak létre a szignalizációban résztvevő fehérjékkel, melyek ezáltal megfelelő közelségbe kerülnek, így képesek kommunikálni egymással [10]. Az állványfehérje egyszerű kötődése több másik fehérjéhez különféle érdekes tulajdonságokat eredményez. Az így kialakult komplex egy olyan mikrokörnyezetnek tekinthető, ahol a résztvevők lokális koncentrációja jelentősen megnő, amelyből adódóan a specificitás fokozódik, ugyanis az enzim potenciális célpontjai szelektíven a megfelelő helyre csoportosulnak [11]. Továbbá, a pozitív és negatív szabályozók egymáshoz való toborzása erősíti a komplex dinamikus viselkedését. Tekintve, hogy az állványfehérjék képesek szabályozni az enzimek katalitikus folyamatait és specifikitását, valamint a komponensek kombinatorikus alkalmazásán keresztül több jelátviteli komplexet is kialakíthatnak a különböző útvonalakban, így a sejten belüli hálózatok korlátozott számú jelátviteli fehérje felhasználásával is tudnak működni a funkciójuk veszélyeztetése nélkül [12]. Az állványfehérjéket tartalmazó „szignaloszómák” kialakulása új lehetőséget nyújt a jelátviteli modulok hálózat szintű dinamikus szabályozására. A teljes modulok könnyen összeállíthatóak sejten belül a megfelelő pozícióban, mert a komplex tagjai egy csoportban szállíthatók, másfelől egyszerű őket inaktiválni is például az állványfehérjék degradációjával. A komponensek változó erősségű kötődése számos új szabályozási mechanizmus kialakulását teszi lehetővé. Az állványfehérjével kölcsönhatásba lépő enzim konformációja és aktivitása allosztérikus hatásra megváltozhat, ezzel megvalósítva a jelátviteli enzimek konformációs finomhangolását [13]. Emellett az állványfehérjékben kialakultak olyan flexibilis kapcsolódó pontok, amelyek segítségével a hozzájuk kötődő egyéb komponenseket képesek a megfelelő irányba orientálni [14].

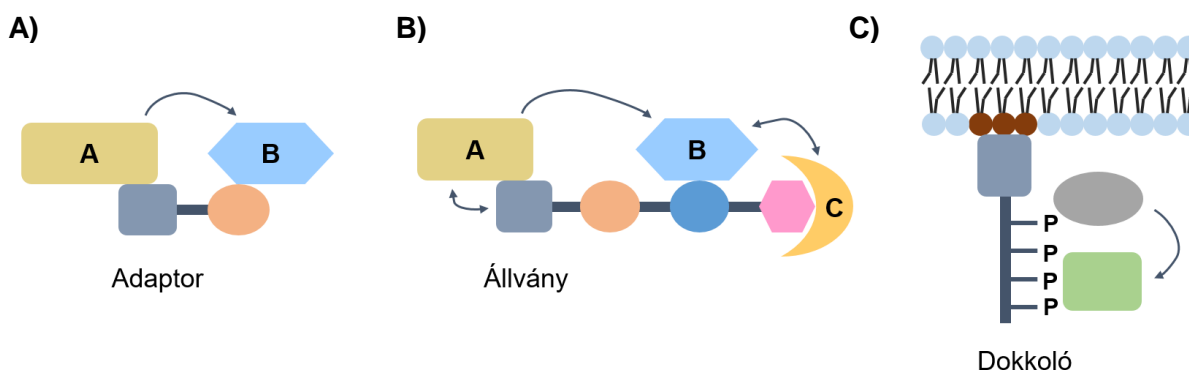
Az eddig leírtakat összegezve, az állványfehérjék működését négy alapmechanizmusra lehet felosztani: az effektív lokális koncentráció biztosítása a jelátviteli komponensek megkötésével; a jelátviteli komplexek összeállítása a komponensek kombinatorikus alkalmazásával; a teljes jelátviteli modulok dinamikus szabályozása (pozitív és negatív

viSSzacsatolás); konformációs finomhangolás (1. ábra). Az állványfehérjékre példa a laborunkban is vizsgált Tks4 fehérje, amely több interakcióra alkalmas doménnel és motívummal, valamint hosszú rendezetlen régiókkal rendelkezik.



1. ábra – Az állványfehérjék működését leíró négy mechanizmus sematikus ábrázolása. A) Az állványfehérjék az enzimek megkötésével megfelelő közelséget alakítanak ki közöttük, így megemelve lokálisan az effektív koncentrációt. B) Lehetővé teszik a jelátviteli komplexek összeállítását az elemek kombinatorikus alkalmazásával, ezáltal bizonyos aktív komponensek a különböző állványfehérjék segítségével többféle jelátviteli útvonalban is részt vehetnek. C) Az állványfehérjék teljes jelátviteli modulokat képesek dinamikusan szabályozni a pozitív és negatív visszacsatolási jelek koordinálásával. D) Egyes állványfehérjék módosíthatják a hozzájuk kötődő enzimek konformációját, illetve a saját konformációjuk is megváltozhat. Forrás: [15]

Érdemes megjegyezni, hogy léteznek további, az állványfehérjékhez nagyon hasonló működésű fehérjék is, ezeket adaptor és dokkoló fehérjéknek nevezzük (2. ábra). Az adaptor fehérjék kis molekulatömegű, 2-3 fehérje-fehérje interakcióra alkalmas doménből vagy kötőszekvenciából álló fehérjék, melyek általában két funkcionális partnert kötnek össze [10].

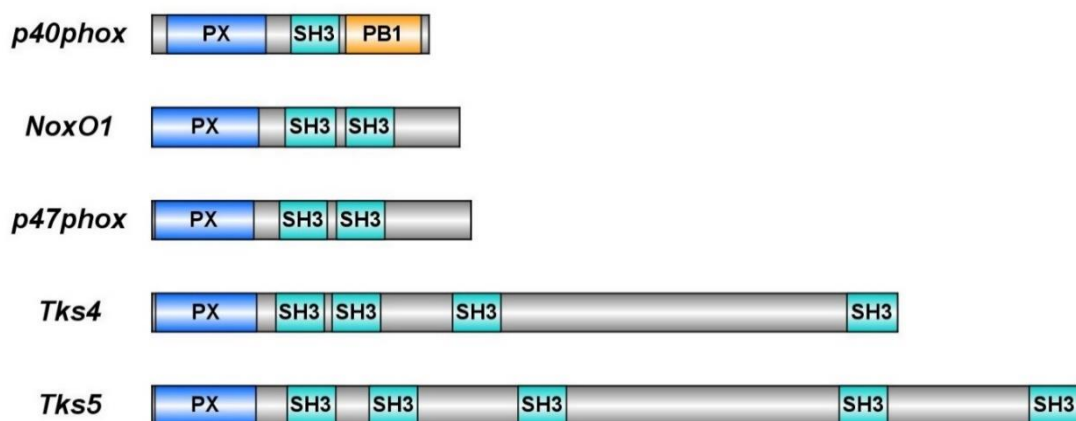


2. ábra – Az adaptor, állvány és dokkoló fehérjék működése. Mindhárom típusú fehérje a jelátvitel szabályozásában vesz részt, azáltal, hogy megköti, irányítja/szabályozza (nyilakkal jelölve), komplexbe szervezi az útvonal egyes komponenseit. A) Az adaptorok általában két kötőhellyel rendelkező kisméretű fehérjék, amelyek két legtöbbször enzimaktivitással rendelkező fehérje megkötésére képesek. B) Az állványfehérjék nagy, több rendezetlen régióval rendelkező multidomén fehérjék, amelyek a jelátviteli útvonal számos tagját képesek megkötni és szabályozni. C) A dokkoló fehérjéknek is az előbbiekhez hasonló a szerkezete és funkciója, azzal a különbséggel, hogy ezek a membránhoz, az aktivált receptorok mellé lokalizálódnak és tirozin foszforilációjuktól függően köthetnek elsősorban SH2 doménnel rendelkező fehérje partnereket. Az A, B, C egyéb fehérjéket, a P a foszforilált aminosavakat jelöli. Forrás: [10]

A dokkoló fehérjéket először a receptor tirozin kinázok kiegészítőjeként írták le, amelyek képesek a membránhoz, az aktivált receptor mellé lokalizálódni és a foszforilációs állapotuktól függően fehérje partnereket megkötni [16]. A szerkezetükre jellemző magas szintű rendezetlenség (átlagosan 43.3%) teszi lehetővé a legfontosabb funkcionális tulajdonságok kialakulását, mint a különböző partnerek kombinált megkötését.

3.2 A Tks4 állványfehérje szerkezete

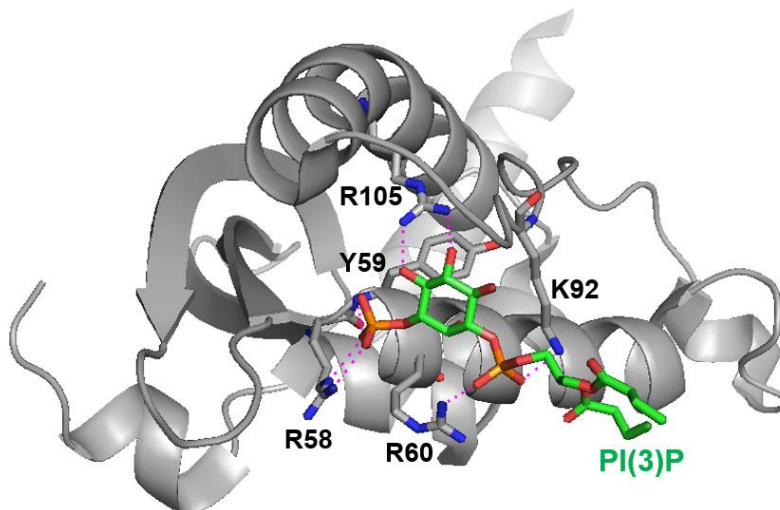
A p47phox-rokonságba tartozó regulátorfehérjék szupercsaládjának ismert tagjai többek között a p40phox, a p47phox, a NoxO1, valamint ide tartoznak a Tks fehérjék, a Tks5 és közeli ortológja, a Tks4 is [2]. A Tks4 állványfehérjét először az adipocita differenciáció mechanizmusának tanulmányozása során fedezték fel, több évvel a szerkezetében és funkciójában is nagyon hasonló Tks5 azonosítása után. Elsőként egér 3T3-L1 preadipocita sejtekből izolálták és fad49 (adipocita differenciációs faktor 49) néven írták le, ám később Tks4 (tirozin kináz szubsztrát négy SH3 doménnel) néven és az *SH3PXD2B* gén termékeként vált ismertté [1], [17], [18]. Ez a nagyméretű, multidomén állványfehérje 911 aminosav hosszú és az N-terminális végén egy PX (phox homology) domén található, melyet négy SH3 (Src homology 3) domén követ (3. ábra). A doméneket összekötő rendezetlen szakaszokon több prolinban gazdag régió is található, melyek potenciális SH3 domén kötő PxxP motívumokat is tartalmaznak. A Tks5-höz hasonlóan a Tks4 is szubsztrátja az Src kináznak, mind sejten belül mind *in vitro*. Összesen három Src által foszforilált tirozint azonosítottak a 25-ös, 373-as és 508-as pozíciókban, melyek a PhosphoSitePlus adatbázisban is szerepelnek és alkalmasak lehetnek SH2 (Src homology 2) doménnel rendelkező fehérjék kötésére [18], [19]. Bár a Tks5 és Tks4 közötti homológia nagy, a teljes azonosság 43% a két fehérje egymáshoz illesztett aminosav szekvenciájában, ennek főként a konzervált domének az okai, mivel a doméneket összekötő szakaszok csak alacsony, 12 %-os identitást mutatnak. Emellett érdemes megjegyezni, hogy a Tks4 nem egyszerűen a Tks5 rövidebb változata, ugyanis a Tks4 negyedik SH3 doménje a Tks5 ötödik doménjének felel meg, vele mutat nagyfokú hasonlóságot [1]. A Tks5 negyedik doménje és az azt körülvevő szekvenciák a Tks4-ben nem konzerváltak, helyükön egy még hosszabb rendezetlen linker található. A Tks4 szöveti expressziója a Tks5 rokon fehérjénél még szélesebb körű, valamint kimutatták, hogy embrionális szövetekben nagyobb mennyiségben van jelen, mint a felnőtt mintákban, de T- és B-limfocitákban, differenciálatlan monocitákban nem fejeződik ki [1], [18].



3. ábra – A p47phox-rokonságba tartozó regulátorfehérjék doménszerkezete. Az Src szubsztrátjaként azonosított Tks4 és Tks5 hasonló domén architektúrát és összetételt mutat, mint más ismert NADPH-oxidáz szabályozó fehérjék. PX: Phox homology domain, SH3: Src homology 3 domain, PB1: Phox and Bem 1p domain. Forrás: [2]

Ahogy az előbbieken is említésre került, a Tks4 állványfehérje N-terminális végén található egy PX domén, amelyet elsőként a neutrofil NADPH oxidáz komplex alegységeiben, a p40phox és p47phox fehérjékben azonosítottak [20]. A PX domének olyan konzervált szerkezeti elemek, amelyek a membránokban található foszfatidilinozitol származékokhoz képesek kötődni. Hasonló foszfatidilinozitol-kötő domén a már régebb óta ismert PH (pleckstrin homology) domén, illetve a C2 (PKC conserved region 2) FYVE (Fab1, YOTB, Vac1 and EEA1) és ENTH (epsin N-terminal homology) domének [21], [22]. A PX domén számos fehérjében megtalálható, amelyek igen változatos funkcióval rendelkeznek, jelátviteli útvonalakban, membrán transzportban, membrán újjáépítésben, illetve a sejtmozgásban is szerepet játszanak, többségüket az SNX (sorting nexins) csoportjába sorolják [23]–[26]. Jelenleg a SMART adatbázisban 108 humán fehérje rendelkezik PX doménnel [27], [28]. A PX „fold” egy, kb. 130 aminosav hosszúságú, több jól konzervált régióval (bázikus aminosavak és egy prolinban gazdag szakasz) rendelkező globuláris domén, melynek szerkezete a különböző NMR mérésekből már jól ismert. A szerkezeti mérésekből kiderült, hogy a domén három antiparallel β -redőből ($\beta 1$, $\beta 2$ és $\beta 3$) és három α -hélixből ($\alpha 1$, $\alpha 2$ és $\alpha 3$) épül fel, melyek lapos, kompakt alakba rendeződnek [29], [30]. Az irodalmi adatok alapján létezik egy kinyújtott formája is a PX doménnek, amely két további α -hélixet tartalmaz a C-terminális végén [31]. Több PX domén szerkezetét fő kötőpartnerével, a foszfatidilinozitol-3-foszfáttal, PI(3)P, egy komplexben is sikerült megfejteni [32], [33]. A p40phox modelljét tanulmányozva látható (4. ábra), hogy a PX doménben található konzervált R58 az egyik kritikus pont a PI(3)P kötés szempontjából, mivel ez alakít ki hidrogén hidat az inozitol gyűrű 3-as foszfátjával. Több különböző kölcsönhatás stabilizálja tovább a kötődést, ilyen a Y59 és R60 oldalláncokkal való

hidrogén-kötés, emellett a rendkívül konzervált R105 is megfelelő közelségben van egy sóhíd létrehozásához. Ennek a 105-ös argininnak köszönhető a domén nagy szelektivitása a 3-as helyen foszforilált inozitol gyűrűre, mivel más esetekben sztérikus gátlás alakul ki. Ezen kívül a K92 és R60 hidrogén-hidat tud képezni az 1-es helyen elhelyezkedő foszfáttal [32].

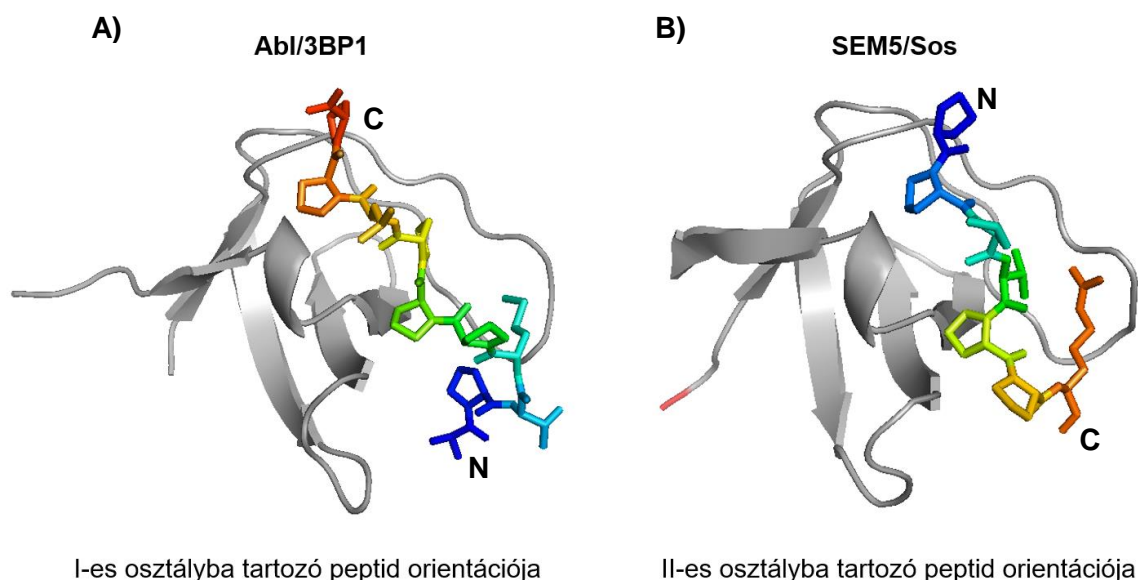


4. ábra – A p40phox fehérjéből származó PX domén szerkezete PI(3)P kötött állapotban. A lipidmolekula (zöld) megkötése a PX doménen (szürke) konzervált R58, Y59, R60, K92 és R105 oldalláncokon keresztül valósul meg. Az ábrán a kötések a rózsaszín szaggatott vonalak jelzik. (PDB: 1H6H) Forrás [32]

Bár a PI(3)P kötődik leggyakrabban a PX doménekhez, leírtak már számos esetet, ahol más foszfatidilinozitolal alakul ki interakció. Léteznek olyan fehérjék is, amelyek PX doménje egyáltalán nem köti a PI(3)P-t, helyette különböző foszfatidilinozitol változatokat preferálnak, ilyen a foszfolipáz D1 (PLD1), NoxO1, CISK, CPK [34]–[38]. További példa a p47phox, amely PX doménje két külön kötőhellyel rendelkezik. Az egyik hely a p40phox lipid-kötő zsebével analóg, azzal a különbséggel, hogy ez elsődlegesen PI(3,4)P₂-t köt, míg a másik hely foszfatidsavra (PA) és foszfatidil-szerinre (PS) specifikus [33], [39]. Bár a PX domént főként lipid-kötő modulként tartják számon, egyre több tanulmány fókuszál a fehérje-fehérje interakciós képességére, amelyet az $\alpha 1$ és $\alpha 2$ hélixek között elhelyezkedő, közismerten SH3 domének megkötésére alkalmas PxxP motívum tesz lehetővé [23], [40]. Számos fehérje a PX doménje mellett rendelkezik SH3 doménnel is, amely ezáltal képes inter- vagy intramolekuláris kölcsönhatások kialakítására. A molekulák közötti kapcsolatra több példát is találunk az irodalomban, mint a PLC γ 1, Homer1b és PIPKI γ SH3 doménjének interakciója a PLD1 és 2, az SNX6, illetve az SNX5 PX doménjével [41]–[43]. A molekulán belüli kötődést a p47phox esete szemlélteti, ahol a PX doménen belüli prolinban gazdag régió a fehérje saját, C-terminális SH3 doménjét köti intramolekulárisan, így inaktív állapotot eredményezve [30].

A Tks4 PX doménje laborunk korábbi eredményei alapján valamennyi foszforilált inozitol gyűrűt tartalmazó lipiddel képes kölcsönhatást kialakítani [4]. Ebben az esetben is vizsgálták a domén fehérje interakciós képességét, amely során kimutatták, hogy a PX doménben található PxxP motívum *in vitro* köti a Tks4 saját harmadik SH3 doménjét [17], amely miatt feltételezhetően a p47phox-hoz hasonló inaktív zárt konformáció alakul ki.

A Tks4 állványfehérjében előforduló másik meghatározó szerkezeti elem az SH3 domén, amelyből négy található az PX domént követően. Az Src homology 3 (SH3) domén egy jól ismert, más fehérjék prolinban gazdag régióját felismerni és megkötni képes interakciós modul, melyet már évtizedekkel ezelőtt leírtak [44], [45]. A kb. 60 aminosav hosszúságú és filogenetikailag erősen konzervált domének leginkább a jelátviteli, a sejtciklust szabályozó és a citoszeletális fehérjékben fordulnak elő. Az első szerkezeti elemzések az Src kinázból és a spektrinből származtak [46], [47]. Az SH3 domén központi részét öt szálból ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ és $\beta 5$) álló két antiparallel β -lemez alkotja, melyeket három hurok és egy rövid hélix kapcsol össze. A lemezeket összekötő szakaszok közül a leghosszabb az RT-hurok, amely a benne található fontos arginin (R) és treonin (T) oldalláncokról kapta a nevét. Az SH3 domének legjobban ismert kötőpartnerei a prolinban gazdag (PxxP) motívumot hordozó peptid szakaszok. Ezek a peptidek a kollagénhez hasonló, balmenetes hélix szerkezetet vesznek fel, ahol három aminosav alkot egy fordulatot. A hélix szimmetriája miatt a kötődés két ellentétes orientációban valósulhat meg, amely alapján két klasszikus osztályt lehet megkülönböztetni (5. ábra).



5. ábra – Az SH3 domének által preferált prolinban gazdag peptidek kötődése kétféle orientációban. A) Az Abl tirozin kináz röntgen diffrakciós szerkezete az első osztályba tartozó 3BP-1 szintetikus peptiddel (APTMPPLPPVPP) komplexben. (PDB: 1ABO) B) A SEM5 C-terminális SH3 doménjének röntgen diffrakciós szerkezete a második osztályba tartozó, Sos fehérjéből származó peptiddel (PPPVPPRRR) komplexben. (PDB: 1SEM) Forrás: [48]

Az első osztályra a +xxPxxP szekvencia jellemző, ahol a központi PxxP motívum előtt helyezkedik el egy pozitívan töltött aminosav (leginkább arginin vagy lizin). A második osztályba a xPxxPx+ szekvenciával rendelkező peptidek tartoznak, ebben az esetben a pozitív aminosav a PxxP motívumtól C-terminális irányban található. A kötés kialakulásához a pozitívan töltött aminosavak az SH3-ban található RT-hurok negatívan töltött aminosavai által alkotott zsebbe illeszkednek, míg a poliprolin hélixek egy-egy csavarulata másik két, aromás aminosavakat tartalmazó kötőfelszínhez kapcsolódnak [48]–[50].

Az SH3 domének vizsgálatából kiderült, hogy nem csak olyan ligandumokat képesek megkötni, amelyek PxxP motívummal rendelkeznek, hanem léteznek ettől eltérő esetek is. Ilyen például a PAK kináz és az Eps8 tirozin kináz, melyek speciális prolin tartalmú szekvenciákat kötnek [51], [52]. Az eddig említett interakciókban közös, hogy mind az SH3 kanonikus kötőhelyén jöttek létre, viszont akadnak olyan atipikus ligandumok is, amelyek a domén egészen más részéhez kapcsolódnak. Ilyen a Vav és Grb2 kapcsolata is, amely során a fehérjék SH3 doménjei lépnek kölcsönhatásba egymással [53]. Hasonló példa a Pex13p, amely SH3 doménje a klasszikus PxxP kötőzsebtől eltérő helyen a Pex5p-t egy α -helikális elemen keresztül köti meg [54]. Továbbá találtak már olyan SH3 doméneket is, amelyek prolint nem tartalmazó szekvenciákat egyaránt képesek kötni, ez jellemzi az Fyb adapter fehérjében található SH3 domént [55]. Ám a fehérje-fehérje interakción kívül egészen új funkcióval is rendelkezhetnek, mint a lipid kötés, amelyet a Caskin1 SH3 domén esetében munkacsoportunk mutatott ki [56]. Az SH3 domének általában 1:1 sztöchiometriával kötik meg a partner fehérje prolinban gazdag régióját, azonban ez alól is ismerünk kivételt, melyet „szuper SH3” vagy „tandem SH3”-nak neveznek. A p47phox esetében írták le először, hogy a ligandum megkötésében a fehérje két, egymást követő SH3 doménjének együttműködése szükséges [57]. A p47phox nyugvó állapotában az asszociált SH3 domének a C-terminális végen található polibázikus régióval lépnek kapcsolatba, ezzel megakadályozva más partner fehérjék kötődését. Az így kialakult állapotot autoinhibitoros konformációnak nevezzük, amely számos kináz enzimatis aktivitását befolyásolja, ilyen az Src vagy a Hck kináz [58], [59].

Az SH3 domének által létrehozott fehérje-fehérje kapcsolatok mindkét fél irányából szabályozhatóak, amelyek legtöbbször reverzibilis módon, foszforiláció útján valósulnak meg. Az SH3 domének tirozin, vagy a kötő partnerek szerin/treonin foszforilációja nagy valószínűséggel a köztük lévő interakció gyengüléséhez vagy megszűnéséhez vezet [60], [61]. Az SH3 doménen történő foszforilációról kevesebb információ áll rendelkezésünkre, míg ez a prolinban gazdag régiók esetében már jól ismert [62]. Laborunk korábban kimutatta, hogy a Caskin1 állványfehérje SH3 doménjének tirozinon történő foszforilációja megváltoztatja

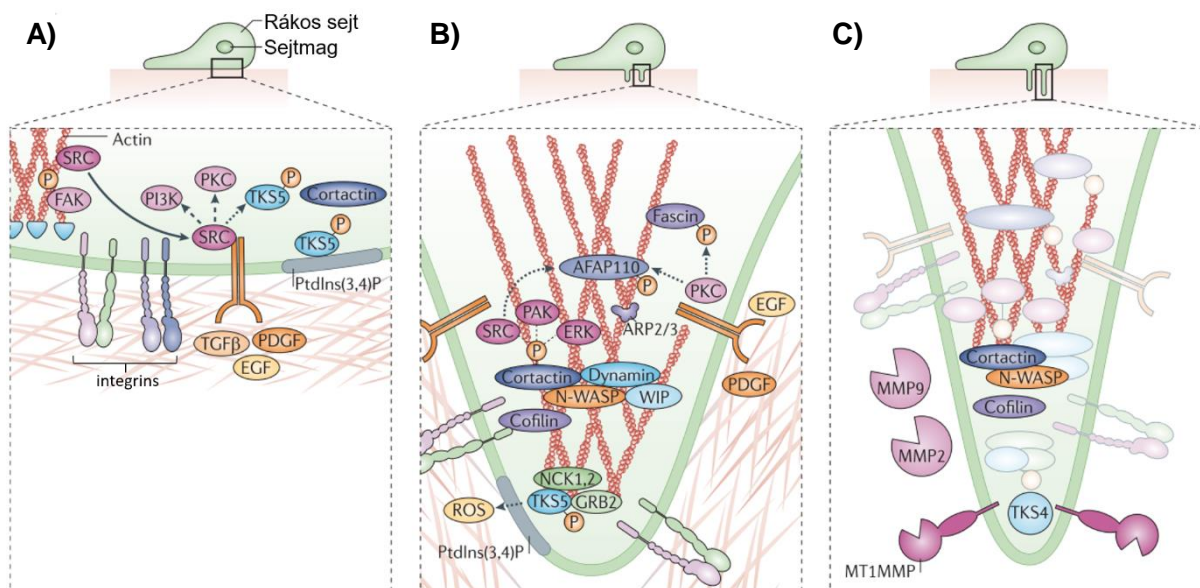
harmadlagos szerkezetét, bár ennek a ligandum kötődésére gyakorolt hatása még nem tisztázott [63].

Bár a Tks fehérjék több fehérje-fehérje interakcióra alkalmas egységgel rendelkeznek, egyelőre viszonylag kevés kötőpartnerüket sikerült azonosítani. Az ADAM családban tartozó metalloproteázok közül az ADAM15 fehérjével mutattak ki interakciót mindkét állványfehérje esetében, a Tks5-nél az ötödik, a Tks4-nél pedig az előbbihez legjobban hasonlító negyedik SH3 domén vesz részt a kölcsönhatás kialakításában [64], [65]. A Tks5 ötödik SH3 doménje az ADAM19 és 12 fehérjékhez is kötődik, míg a Tks4 esetében erről még nem áll rendelkezésünkre információ. Továbbá szintén mindkét fehérje kapcsolatát leírták a NoxA1 fehérjével [3]. A Tks5 egyik legjobban jellemzett interakciója az Sos fehérjékkel jön létre, az első és harmadik SH3 domén, mint tandem SH3, közreműködésével [66].

3.3 A Tks4 állványfehérje élettani szerepe

A Tks fehérjék nem csupán passzív állványfehérjék, hanem a jelátviteli utak aktív résztvevői, melyre számos, különböző biológiai folyamatban leírt szerepük is utal. Az egyik legjobban tanulmányozott funkciójuk a podoszómák vagy invadopódiumok kialakulásában való közreműködésük. A podoszómák és invadopódiumok (együttes nevükön invadoszómák) dinamikus, aktinban gazdag membrán kitüremkedések, amelyek a vándorló vagy invazív sejtek ventrális felszínén jönnek létre. Ezek a struktúrák proteolitikus aktivitást mutatnak az extracelluláris mátrix (ECM) felé, valamint a sejtmigráció és invázió kulcsfontosságú elemei [67]. Annak ellenére, hogy a szerkezetük és funkciójuk rendkívül hasonló, a podoszómák a normál sejtek, például endoteliális vagy simaizom sejtek esetében kialakuló képződmények, míg az invadopódiumok az invazív rákos sejtek és Src-transzformált fibroblasztok esetében jönnek létre [68]. További különbségek figyelhetők meg a méretüket, mennyiségüket és életidejüket tekintve. A podoszómák átlagos mérete 0.5-1 μm körül van és akár több 100 is előfordulhat egy sejten, ezzel szemben az invadopódiumok jóval nagyobbak, méretük elérheti a 8 μm -t is és csupán néhány található belőlük. Emellett az invadopódiumok a podoszómákkal szemben sokkal hosszabb ideig stabilak és megnövekedett proteolitikus aktivitással rendelkeznek [69], [70]. Mindkét invadoszóma fajtára jellemző, hogy egy aktinban gazdag törzsből és azt körülvevő, hozzákapcsolódó állványfehérjékből állnak [71]. A podoszómákban ezt a központi törzset egy adhézión gyűrű veszi körül, mely integrinekből és integrin-asszociált fehérjékből áll. Ez a gyűrű-szerkezet az invadopódiumokban nem található meg [69]. Ugyanakkor közös bennük számos aktin-citoszkeletont szabályozó fehérje jelenléte. Ilyenek

például az új aktin-szálak nukleációjára képes forminok, valamint az elágazódó aktin-hálózatok képződéséhez nélkülözhetetlen Arp2/3 komplex, az őt aktiválni képes WASP, N-WASP, WIP és cortactin fehérjékkel együtt [70]. Tartalmaznak még aktinkötő fehérjéket (tropomyosin, coronin), aktin filamentumokat keresztkötő fehérjéket (α -actinin, caldesmon), adhéziós molekulákat (vinculin, zyxin) valamint kinázokat (Abl, Src, Pyk2) és szabályozó GTPázokat (Rho, Cdc42, dynamin) is [68]. Az extracelluláris mátrix bontásában különböző családokba tartozó proteázok vesznek részt. Ilyenek a cink kofaktorral rendelkező metalloproteázok közé tartozó MMP2, MMP9, MT1-MMP és az ADAM család tagjai [70]. Számos tanulmány kimutatta, hogy normál és rákos sejtekben a podoszómák vagy invadopódiumok képződését különböző növekedési faktorok, mint a PDGF, TGF- β és az EGF indukálják [72]–[74]. A podoszómák/invadopódiumok kialakulásának mechanizmusában első lépésként az Src kináz aktiválódik valamely receptor tirozin kináz hatására és foszforilálja az N-WASP-ot, a Tks4 és Tks5 állványfehérjéket és további jelátviteli molekulákat [75]. A foszforilációt követően a PI3-kináz is aktiválódik [76], majd a Tks5 PX doménjén keresztül a plazmamembránhoz kötődik a PI3-kináz által létrehozott foszfatidilinozitol-3-foszfát származékokon keresztül [64]. A fokális adhéziós zónában lévő Grb2 adapter fehérje az N-terminálisán lévő SH3 doménjével szintén kapcsolódik a Tks5 valamelyik prolinban gazdag motívumához, így kialakítva a további éréshez nélkülözhetetlen fehérjék, mint az N-WASP toborzásához szükséges komplexet. Az N-WASP a Tks5 bármely SH3 doménjén keresztül kialakíthat interakciót, ugyanis ez az Src kináztól teljesen független folyamat [77]. Az N-WASP fehérje az aktivációt követően megköti az Arp2/3 fehérje komplexet, amellyel megindítják az új aktin szálak polimerizációját, ezzel lehetővé téve a sejtek alakváltozását, az aktinban gazdag kitüremkedések létrejöttét [78]. A Tks5-höz hasonlóan, a Tks4 az Src kináz hatására foszforilálódik, a podoszómák/invadopódiumok helyére transzlokálódik, majd magához toborozza a mátrix metalloproteázokat. Ilyenek például az MMP2, MMP9 és MT1-MMP mátrix metalloproteázok, az ADAM családtagjai, a cisztein proteáz katepszinek és a szerin proteázok közé tartozó szeptráz és urokináz plazminogén aktivátorok (UPAR), amelyek az extracelluláris mátrix bontását végzik [1]. Ezzel befejeződik a podoszómák érési folyamata, az aktin filamentumok átszerveződtek, az ECM bontásához szükséges proteázok felsorakoztak, megnő az adott sejt motilitása (6. ábra).



6. ábra – Az invadopódiumok képződésének szakaszai. A) Az iniciációs lépések során a sejtek - az integrinek, az Src és a FAK közreműködésével - fokális adhéziókat alakítanak ki az extracelluláris mátrixszal. Növekedési szignálok hatására intracelluláris változások következnek be, az Src aktiválódik, valamint a Tks5 a plazmamembránhoz kötődik és kolokalizál a cortactinnal. B) Az összeszerelő szakasz folyamán az aktin regulációs fehérjék aktiválódnak (Arp2/3, WIP), a fő fehérjék foszforilálódnak (például cortactin, Tks5, AFAP110), reaktív oxigén származékok termelődnek és megindul az új aktin filamentumok polimerizációja. C) Az érés ideje alatt a Tks4 foszforilálódik, majd a fejlődő struktúra csúcspontjához vándorol, ahol magához toborozza a mátrix metalloproteázokat és megindul az extracelluláris mátrix lebontás. Forrás: [78]

Ahogy korábban említésre került, a Tks4 kulcsfontosságú szereplője a podoszómák/invadopódiumok kialakulásának és az extracelluláris mátrix bontásának, melyet Buschman és munkatársai bizonyítottak [1]. Megfigyelték, hogy az aktivált Src-vel transzformált 3T3 sejtekben az aktin citoszkeleton jelentősen átszerveződött és a Tks4 a keletkező podoszómákba lokalizálódott. Annak érdekében, hogy felderítsék a Tks4 fehérje szerepét a kitüremkedések létrehozásában, gén csendesítéssel akadályozták meg a fehérje majdnem teljes expresszióját. A Tks4 hiánya a podoszóma képződés megszűnését eredményezte, ráadásul a sejt nem volt képes az extracelluláris mátrix emésztésére sem. Ugyanerre a következtetésre jutottak abban az esetben is, amikor egerekből származó fibroblasztokat tanulmányoztak. Mivel a Tks4 és Tks5 nagyon hasonló állványfehérjék, letesztelték mennyire képesek egymás funkcióját betölteni a génkiütött sejtvonalakban. A Tks4-hiányos sejtekben a Tks5 expressziója elég volt ahhoz, hogy részben helyreállítsa a podoszómák képződését, azt sugallva ezzel, hogy a két fehérje szerepe az aktin-szabályozó komponensek összegyűjtésében átfed egymással. Viszont hiába jelennek meg a podoszómák, a sejtek továbbra sem voltak képesek az extracelluláris mátrix emésztésére, valószínűleg azért, mert az MT1-MMP kulcsfontosságú proteáz podoszómákba való toborzását a Tks4 végzi.

További érdekesség, hogy a Tks4-ben található három, az Src által foszforilálódó 25-ös, 373-as és 508-as tirozinok fenil-alaninra történő cseréje, azaz a tirozin foszforiláció megakadályozása szintén gátolja a mátrix degradációját [1].

Az alapján, hogy a Tks állványfehérjék doménszerkezete és aminosav szekvenciája leginkább a NADPH oxidázok szabályozásában szerepet játszó p47phox molekulákhoz hasonlít, felmerül annak lehetősége, hogy a Tks fehérjék is hasonló módon szabályozódnak. A reaktív oxigén származékokat (reactive oxygen species, ROS), mint a szuperoxidok vagy a peroxidok, elsőként a metabolikus folyamatok toxikus melléktermékeiként azonosították, azonban felfedezték, hogy a redukált NADPH oxidázok (Nox) ezeket a származékokat specifikus célokra használja fel [79]. A reaktív oxigén származékok különböző sejten belüli feladatokat látnak el, beleértve a jelátvitel, gén expresszió, sejt növekedés és apoptózis szabályozását is. A ROS termelés fokozott a rákos sejtekben, amely a jelátviteli mechanizmusok zavarára utal [80]–[82]. A Nox fehérje család, amelybe több ismert homológ enzim tartozik, mint a Nox1, Nox2, Nox3 és távolabbi rokonaik a Nox5, Duox1 és Duox2, a reaktív oxigén származékok termelését katalizálják és szabályozzák [83]. A Nox1 enzim ROS termelése révén a keringés szabályozásában, a Nox2 a neutrofil granulociták működésében, a Nox3 a hallócsövecskék kialakulásában, a Nox4 pedig a vese működésében vesz részt [84]. Az első felfedezett Nox enzim a Nox2 volt, melyet granulocitákból izoláltak [85], [86]. Az enzim vizsgálata során azonosították a működéséhez szükséges faktorokat: a p47phox, p67phox és p40phox fehérjéket [87], [88]. Továbbá azonosították a komplex egy fontos stabilizáló, sejtmembránban megtalálható állandó komponensét a p22phox fehérjét [89], illetve a Rac1, Rac2 GTPáz fehérjék szintén részt vesznek a szabályzásban [90]. A sejtaktiváció során foszforilálódik a p47phox fehérje, megszűnik az autoinhibíciós konformációja, amely által a p40phox, p47phox, p67phox, Rac2 komplex kapcsolódik a Nox2 enzimhez, ezzel aktiválva a NADPH enzim komplexet. Megindul a NADPH oxidációja, a felszabaduló elektronok pedig a membránon kilépve molekuláris oxigénből szuperoxidokat redukálnak [91]. A különböző Nox enzimeknek a Nox2 enzimhez nagyon hasonló a szabályozásuk. Mindannyian a p22phox alegységhez kapcsolódnak, de működésükben vannak eltérések is. A Nox1 fehérje a NoxA1 fehérjével lép kapcsolatba a homológ p67phox helyett és működését a NoxO1 szabályozza, nem a p47phox [92].

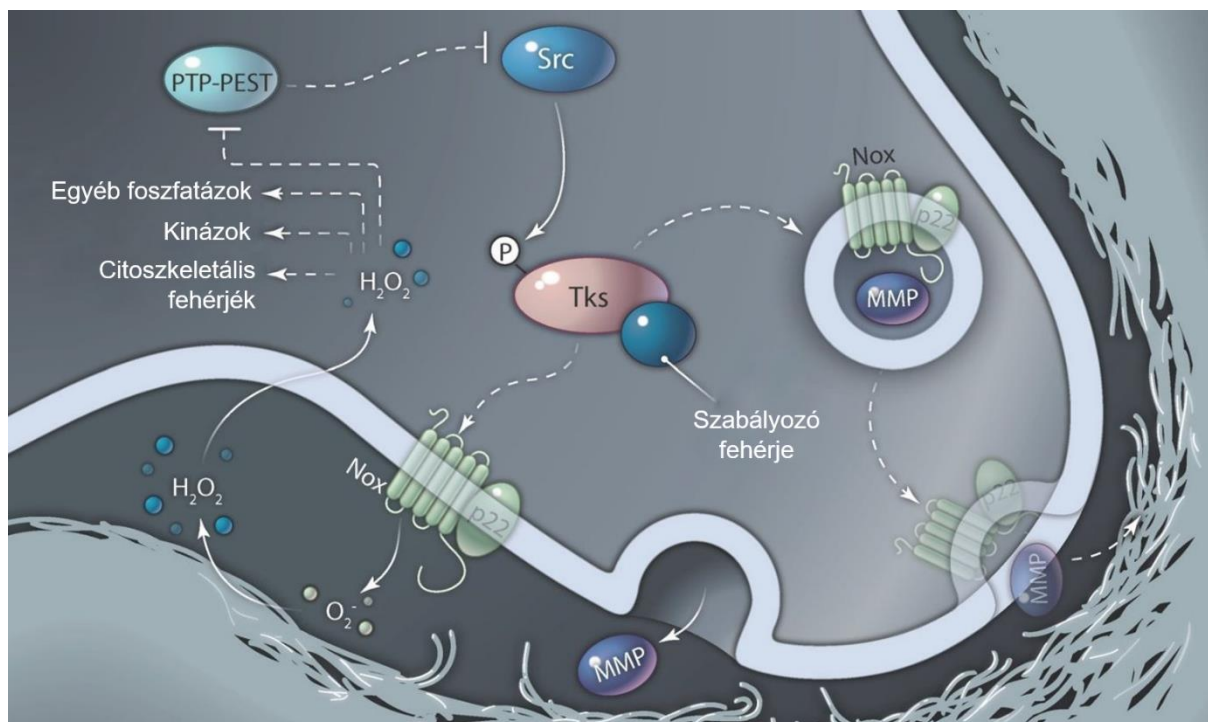
Egy korábbi tanulmányban kimutatták, hogy a Tks fehérjék szintén elősegítik a Nox1 és Nox3 aktivitását [2]. A ROS lokalizációja a podoszómákba/invadopódiumokba feltételezhetően a Tks4 és Tks5 részvétele miatt valósul meg [93]. A Nox fehérjék által termelt reaktív oxigén származékoknak jól ismert szerepe van a foszfatázok inhibíciójában, kinázok aktivációjában

vagy az ioncsatornák szabályozásában, elektrontranszport függő sejt depolarizációban, poszttranszlációs módosításokban. A foszfatázok különösen érzékenyek a katalitikus helyükön található cisztein oldallánc oxidációjára, amely reakció az enzim inaktiválódását okozza, így a ROS jelenléte fokozhatja a tirozin kinázokhoz kötött jelátvitelt [79]. Mivel a ROS-ok gyorsan semlegesítődnek a sejten belül, ezeknek a lokális termelődése kritikus a hely-specifikus jelátviteli tevékenységek szabályozásának szempontjából, valamint ezeken a helyeken a tirozin kinázok aktivitására is lehet számítani [94]. Ez figyelhető meg például az integrinek aktivációját követően a fokális adhéziónk során, miközben a p47phox interakcióba lép a Hic-5 és TRAF4 adapter fehérjékkel [95]. A TRAF4 által kiváltott ROS termelődés a PEST tirozin foszfatáz (protein tyrosine phosphatase PEST, PTP-PEST) inaktiválódását idézi elő, amely elősegíti sejt migrációját. Hasonlóan a fokális adhéziónkhoz, az invadopódiumok is az aktív tirozin kinázok egyik gyűjtőhelye, emellett mindkettő kialakulásában több közös molekuláris komponens is részt vesz, mint a Mena, vinculin, p130Cas, PTP-PEST és Src [79]. A PTP-PEST hiánya az Src-transzformált sejtekben a podoszómák számának jelentős növekedését eredményezte, amely arra utalhat, hogy a ROS-ok egy közös molekuláris mediátoron keresztül szabályozzák az invadoszómák kialakulását és a fokális adhéziónk [93]. Továbbá kimutatták azt is, hogy az Src tirozin kináz elősegíti a ROS-ok termelődését [82].

Mivel a Tks fehérjék az Src szubsztrátjai és a Nox enzimek aktivitását is befolyásolják, így elképzelhető, hogy az Src által indukált reaktív oxigén származékok a Tks4 és Tks5 foszforilációján keresztül jönnek létre (7. ábra). Ezt a feltételezést erősíti, hogy a Tks5 hiánya megszünteti az Src transzformációjával kiváltott fokozott ROS termelődést a 3T3 fibroblasztokban és teljesen mértékben lecsökkenti a képződésüket a rákos sejtekben [93]. Továbbá a reaktív oxigén származékok az MMP expresszióját is szabályozhatják, amely az invadopódiumok mátrix bontó képességéhez szükséges, és felmerül annak a lehetősége, hogy a Nox enzimek aktivációját követően a proteáz tartalmú vezikulumok a Tks fehérjék közreműködésével kialakult invadopódiumokkal fuzionáljanak (7. ábra).

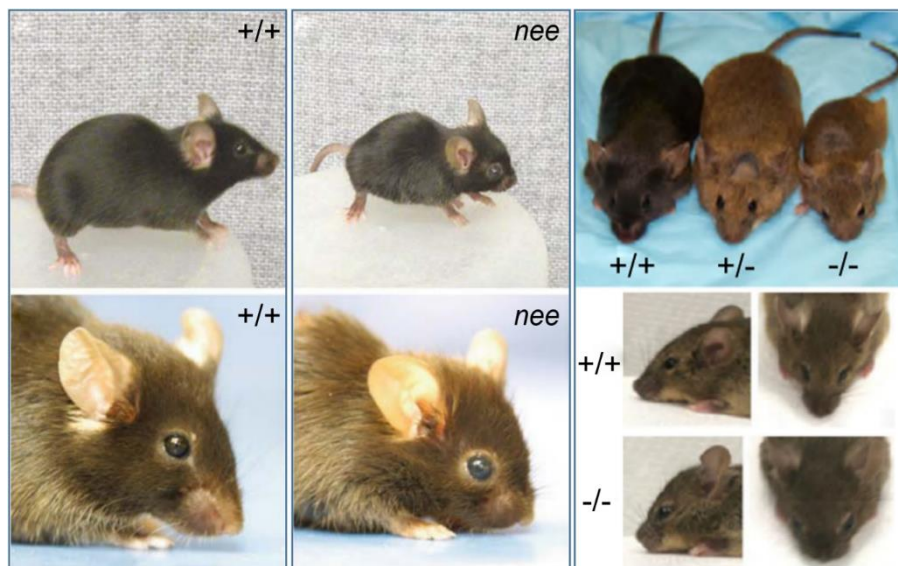
Az eddig leírt funkciókon kívül a Tks fehérjékről azt is kimutatták, hogy részt vesznek bizonyos sejtípusok differenciációjában. Az első megfigyelések alapján leírták, hogy a Tks4 jelenléte szükséges az adipogenezis korai szakaszában a sejtszám növeléséhez és a sejtek zsír irányú elköteleződéséhez [17].

Később a Tks fehérjék egyedfejlődésben betöltött szerepét génhiányos állatmodelleken vizsgálták.



7. ábra – A potenciális ROS jelátviteli útvonalak az invadopódiumban. Az Src által foszforilált Tks4 vagy Tks5 hozzájárulhat a membrán-lokalizált Nox enzimek toborzásához a keletkező invadopódiumban. A Tks fehérjékkel asszociált Nox-szabályozó fehérjék transzlokációja a p22phox-Nox komplexek kötődéséhez, a Nox aktivációjához, valamint a reaktív oxigén származékok termelődéséhez vezet. A résztvevő fehérjékben, mint a PTP-PEST, a redox-érzékeny aminosavak oxidációja fokozza az invadopódiomok kialakulását és működését. Forrás: [79]

Az úgynevezett *nee* (nose, eye, ear) mutáns egerek tanulmányozása során a Tks4 génjének utolsó exonjában találtak egy egy bázispáros deléciót, amely kereteltolódást, és ennek következtében korai STOP kodont eredményezett [65]. Bár ennek a mutációnak a hatása a harmadik SH3 domén egy részét és az ezt követő C-terminális irányban lévő szakaszokat érinti, mégis azt tapasztalták, hogy a teljes fehérje hiányzik a *nee* egerek sejtjeiből [18]. Az állatokat makroszkóposan vizsgálva elsősorban azok kis mérete, az agy- és arckoponya rendellenes alakja, és a szemek abnormális megjelenése szembetűnő (8. ábra). A részletesebb vizsgálat során kiderült, hogy mind a hím mind a nőstény állatok terméketlenek, csontjaik deformáltak és csökkent sűrűségűek, hallásuk sérült, valamint 3-4 hónapos korukban glaukóma fejlődik ki náluk [65], [96]–[98]. A későbbiekben sikerült célzottan, gén csapda módszerrel, létrehozni olyan egereket, melyeknek szövetei nem tartalmaznak immunoblottal kimutatható Tks4 fehérjét [5]. Ezek az egerek morfológiailag nagyon hasonlóak a *nee* egerekhez, valamint a részletes szövettani vizsgálatok alapján szív-rendellenességeket mutattak ki náluk. A Tks4-hiányos egerekhez nagyon hasonló tünetek figyelhetők meg a Frank-ter Haar szindrómás betegeken, melynek részletes leírása a következő fejezetben olvasható.

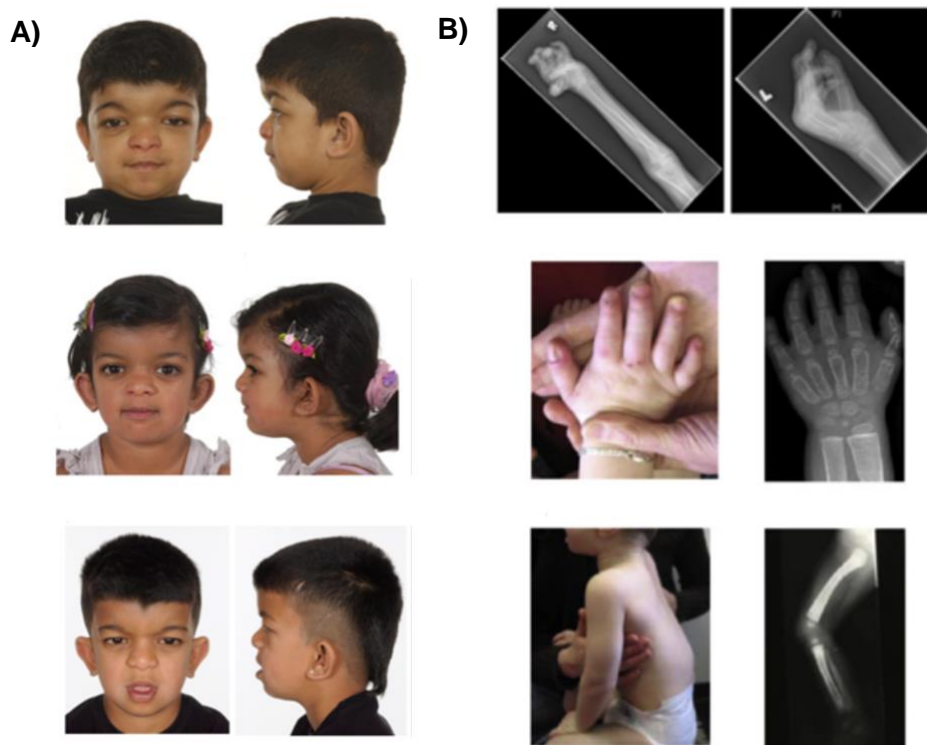


8. ábra – A vad típusú, a *nee* és a géncsapdával előállított *Tks4*-hiányos egerek. A vad típusú (+/+) egérrel összehasonlítva megfigyelhető a *Tks4*-hiányos egerek (*nee* és -/-) kisebb testmérete, valamint a jellegzetes koponyadeformitásuk. Forrás: [5], [65]

3.4 Frank-ter Haar szindróma

A Frank-ter Haar szindróma (FTHS, OMIM: 249420) egy igen ritka autoszomális recesszív rendellenesség, melyet Yitzhak Frank és Ben ter Haar írt le először a 70-es években [99], [100]. A tünetegyüttes fő jellemzői a rövidfejűség, a tág kutacsok, előugró homlok és szemek, macrocornea, gyakran glaukóma. A koponya deformitásai mellé számos egyéb, főként a csontvázat érintő elváltozás társul, mint például a hosszú csontok hajlottsága, vagy a háti kifózis (9. ábra) [101]. A betegségben szenvedő gyermekek általában csecsemő-, vagy fiatal gyermekkorban meghalnak szív- és érrendszeri rendellenességek, légúti fertőzések vagy egyéb, ismeretlen okok következtében.

Egy fiú testvérpár esetében írtak le egy súlyos progresszív multisisztémás betegséget, a Borrone-dermato-kardio-szkeletális szindrómát (BDCS), amelynél a tünetek számos ponton átfednek a Frank-ter Haar szindrómánál megfigyelttel [102]. Mivel a betegségek által okozott fenotípus nagyon hasonló, valamint mindkét szindrómánál kimutatták a *Tks4* génjének mutációját [103], felmerül a kérdés, hogy nem egyetlen kórról van-e szó. Néhány tünet esetében látható különbség, mint egyes szemrendellenességek, melyet gyakran észleltek FTHS-s betegeknél, míg BDCS-ben szenvedők esetében vagy nem figyeltek meg, vagy nem jelentettek hasonlót. Mégis az a valószínűbb, hogy a két leírt szindróma egy és ugyanaz, csak a betegségek egymástól független, első leírásakor még nem ismerték azok genetika hátterét, ami viszont a kérdés eldöntésében egyértelmű bizonyítéknak tűnik.



9. ábra – Frank-ter Haar szindrómás betegek. A) Jellemző arcdeformitások. Leginkább a rövidfejűség, az előreugró homlok, a kisméretű állkapocs és a nagy szemek feltűnőek. B) A csontváz egyéb deformitásai. A kézen az ujjak rövidegsége és deformitása (középen és fent), a hosszú csontok hajlottósága (lent jobbra) és a gerinc fokozott háti kifőzisa (lent balra) a figyelhető meg. Forrás: [5], [104]

Frank és munkatársai egy 18 hónapos beduin kislány esetében, aki egy apától származó szülőkkkel rendelkezett, megalocorneát, különböző csonttani elváltozásokat és elmaradt fejlődést állapítottak meg. Javaslatuk szerint ez az összetett rendellenesség egy addig nem ismert betegségként kezelendő [99]. Ter Haar és munkatársai három esetet írtak le szintén csonttani elváltozásokkal, illetve rendellenes arcvonásokkal (nagy szemek, kisebb állkapocs), továbbá megfigyelhető volt az elülső kutacs kései záródása és a koponyalap csontszerkezetének szklerotikussága, amely tünetek alapján Melnick-Needles (OMIM: 309350) szindrómára gyanakodtak [100]. Egy újabb páciens esetében veleszületett glaukómát, rendellenes koponyaalakot (rövidfejűséget), lapos nyakszirtet és nagy elülső kutacsot, kifőzist, kiemelkedő farokcsontot, rövid végtagokat, hajlott ujjakat és dongalábat figyeltek meg. Emellett kardiovaszkuláris abnormalitásokat is találtak. A beteg ugyanahhoz a családhoz tartozott, mint a ter Haar által vizsgált három hasonló fenotípusú beteg, így először ebben az esetben is a Melnick-Needles szindróma autoszomális recesszív formáját állapították meg. Ám Hamel és munkatársai szerint ez a kórmegállapítás már nem állja meg a helyét, ugyanis a veleszületett zöldhályog, a kiemelkedő farokcsont bőrredővel és a kardiovaszkuláris abnormalitások okozta korai halálozás miatt a betegek mégsem a Melnick-Needles szindrómában szenvednek. Arra a megállapításra jutottak, hogy a ter Haar által vizsgált három és az előbb említett általuk leírt

beteg egy új autoszomális recesszív öröklődésű betegségről, javaslatuk szerint a ter Haar szindrómáról van szó [105]. Az előbbi meghatározás alapján, ehhez a szindrómához sorolják a Billette de Villemeur és munkatársai által hasonló tünetekkel diagnosztizált, szintén egy apától származó szülők gyermekeit is [106]. Egy Puerto Rico-i fiú esetét Wallerstein és munkatársai írták le, ahol a szülők első unokatestvérek voltak. A gyermek a rendellenességei ellenére szokatlanul magas, 13 éves kort ért el és nála állapítottak meg először elmaradást a mentális és fizikális fejlődésben. Továbbá megemlítenek egy új fenotípust, a szubkután zsír jelentősen csökkent mennyiségét vagy hiányát [107]. Megarbane és munkatársai is beszámoltak két, a korábbiakhoz igen hasonló esetről, ahol a szülők szintén első unokatestvérek voltak. Az átfedő tünetek közé tartozik a veleszületett glaukóma, nagy elülső kutacs, kiugró homlok, széles és lapos orrnyereg, magasan ívelt szájpadlás, kitüremkedő farokcsont bőrredővel, rövid és hajlott ujjak és lábujjak, dongaláb és egyéb csontrendszeret érintő deformitások, amelyek alapján a ter Haar szindrómát diagnosztizálták [108]. További 3 páciensnél figyeltek meg a Hajdu-Cheney (OMIM: 102500) és a Frank-ter Haar szindrómához hasonló tüneteket [109]. Maas és munkatársai ezeknél a betegeknél inkább az FTHS-t valószínűsítették, valamint pontosan ismertették a tünetegyüttes kritériumait, illetve felvetették annak lehetőségét, hogy anyagcsere rendellenességre vezethető vissza a betegség [101]. Wilson és munkatársai kimutatták a Tks4 génjének sérülését egy kisfiú esetében, akinek a szülei unokatestvérek voltak, majd a tünetek alapján Borrone-dermato-kardio-szkeletális szindrómát állapítottak meg nála. A gyermeknél a csontrendszeri diszplázia sokkal súlyosabb formában jelentkezett, mint a többi diagnosztizált betegnél, valamint az idő múlásával állapota fokozatosan rosszabbodott, míg fiatal korában elhunyt [103]. Néhány éve Aktas és munkatársai egy 21 napos, egy apától származó szülőkkal rendelkező, FTHS-el diagnosztizált kisfiú esetében végeztek átfogó szemvizsgálatot, amelynek során távol ülő szemeket, kétoldali szemhéjcsüngést, lefelé irányuló szemhéj hasadékokat és szaruhártya vizenyőt figyeltek meg, valamint a veleszületett glaukómát a szindróma egyik anatómiai jellemzőjeként határozták meg [110].

A Frank-ter Haar szindrómát olyan gyermekeknél is leírták már, akiknek a szülei nem álltak rokoni kapcsolatban egymással. Két ilyen beteg ismert eddig, az egyik Femitha és munkatársai által vizsgált újszülött fiúgyermek [111], a másik pedig Zrhidri és munkatársai által diagnosztizált 2 éves kislány [112].

Köse és munkatársai jelentettek meg egy tanulmányt 2016-ben egy fiúról, akinél 6 éves korában határozták meg az FTHS-t. A beteg a kézirat megjelenésekor 21 éves volt, amely az ismert tünetek mellett meglepően magas életkor. Ebben az esetben részletes száj és fogászati vizsgálatokat is végeztek, amelynek során állkapocs és fognövekedési rendellenességeket

figyeltek meg. Emellett a betegen felfedezhető a szindrómára jellemző, korábbi esetekben már tapasztalt kóros fenotípus is [113].

A jelenlegi ismereteink alapján eddig hatféle mutációt sikerült beazonosítani a Tks4 állványfehérjét kódoló *SH3PXD2B* génen belül. A Frank-ter Haar szindrómával diagnosztizált családok esetében az *SH3PXD2B* gént érintő négy különböző intragenikus mutációról és egy teljes delécióról [5], valamint egy alkalommal a 13. exon deléciójáról számoltak be [104]. Ezeken kívül két új, funkcióvesztéssel járó mutációt azonosítottak az *SH3PXD2B* génben olyan betegeknél, akiknél az FTTHS-hez hasonló Borrone-dermato-kardio-szkeletális szindrómát állapították meg [103]. Továbbá, az *SH3PXD2B* gén két másik változatát írták le az Axenfeld-Rieger szindróma és a nyitott zugú glaukóma (Primary open-angle glaucoma, POAG) esetében [97]. Az FTTHS betegek nagyjából felénél (13-ból 7-nél) missense és frameshift mutációkat találtak a Tks4 génjében, viszont a többi betegnél nem mutattak ki eltérést, amely a szindróma genetikai heterogenitására utal [5]. Ebből adódóan valószínűsíthető, hogy ezeknél az FTTHS betegeknél olyan génekben található a defektus, amelyek az *SH3PXD2B* génnel vannak kölcsönhatásban és/vagy a podoszómák képződésében vagy funkciójában játszanak szerepet.

3.5 Mesenchymalis őssejtek (MSC-k)

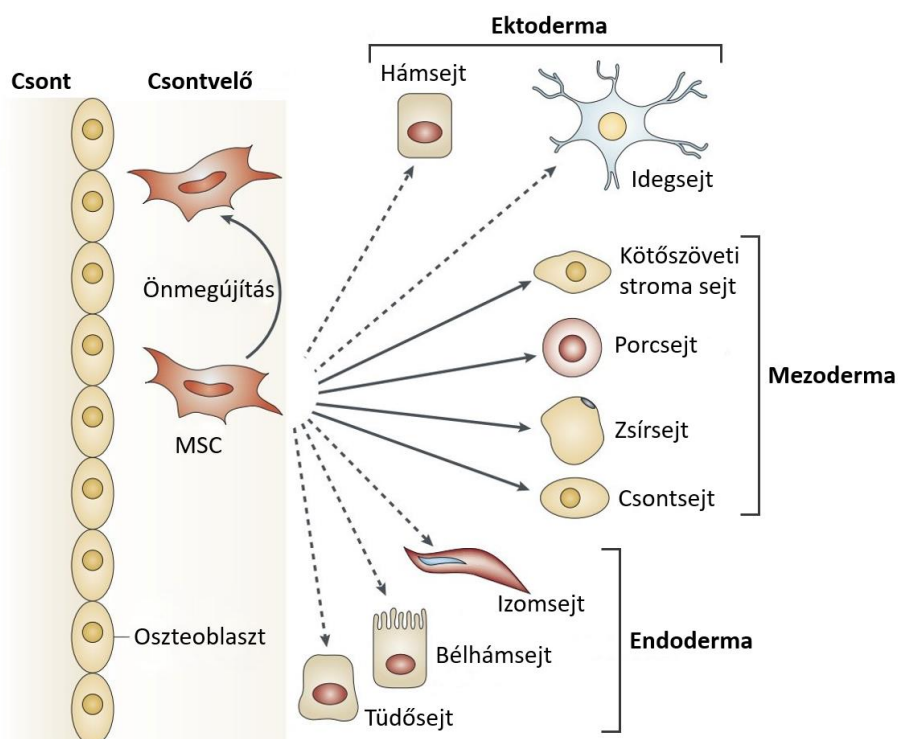
Az elmúlt évtizedben az őssejtek klinikai alkalmazása egyre nagyobb lendületet vett, köszönhetően a sikeres klinikai vizsgálatoknak, valamint az őssejtek kedvező hatásaiért felelős mechanizmusok megértésének. Az őssejtek általánosan embrionális vagy felnőtt őssejtekként jellemezhetőek. A regeneratív gyógyításban elméletileg az embrionális őssejt (embryonic stem cell, ESC) tűnik a legváltozatosabban alkalmazható őssejt típusnak. Az embrionális őssejtek hierarchiájában totipotensnek nevezzük a megtermékenyített petesejtől származó sejteket, melyek egyaránt képesek extraembrionális és embrionális szöveteket létrehozni, valamint a hólyagsírat (blasztocisztát) kialakítani, amelyből később az embrió fejlődik ki. A hólyagsíra belsejéből származó sejtek pluripotensek, melyek már csak az embrionális csíralemezek mentén képesek differenciálódni, belőlük az egyed bármilyen szerve/szövele létrejöhet [114], [115]. A teljesen kifejlett felnőtt szövetek és szervek multipotens felnőtt őssejteket tartalmaznak, amelyek már csak a saját csíralemezük mentén létrejövő szervek/szövetek sejtjeivé, illetve sejtfejlődési soraivá képesek differenciálódni [116]. Az érett testi sejtekből visszaprogramozott úgynevezett indukált pluripotens őssejtek létrehozása [117], valamint a felnőtt őssejtek differenciációjának jellemzése igen bonyolulttá tette a felnőtt őssejtek nomenklaturáját, emiatt a specifikus őssejt típusok meghatározáshoz rugalmasságra és óvatosságra van szükség. Az

őssejtek kulcsfontosságú tulajdonságai közé tartozik a korlátlan önmegújítás és a többsejtvonalúság lehetősége is, azonban az embrionális őssejtek használatát körülvevő etikai kérdések, az ismeretek hiánya a differenciáció specifikus szabályozásáról, valamint a kísérleti modelleknél jelentkező tumorigentiás részben arra ösztönözte a kutatókat, hogy fejlesszenek és alkalmazzanak olyan felnőtt őssejteket, amelyek nem rendelkeznek ezekkel a melléhatásokkal [118]. A nem embrionális, azaz felnőtt őssejtek számos szövetben előfordulnak, mint az agy, a szív, a tüdő, a vese és a lép, azonban a legjobban ismert forrása ezeknek a sejteknek a csontvelő. A felnőtt csontvelő a sejtek heterogén populációját tartalmazza, beleértve a vértképző őssejteket, makrofágokat, vörösvérsejteket, fibroblasztokat, adipocitákat és endotél sejteket [119]. Az előbbieken kívül a nem-vértképző, multipotens őssejtek is szintén megtalálhatóak a csontvelőben, amelyeket korábban csontvelői stroma sejteknek vagy mesenchymalis őssejteknek neveztek, azonban mostanában leginkább mesenchymalis stroma sejtek (MSC) hívják őket [118].

Az MSC-k mezodermális eredetűek, amelyek a klasszikus leírás szerint képesek kötőszöveti, vázizom és érrendszeri sejteket létrehozni. A hagyományos nézet szerint az MSC-ket olyan őssejtekként lehetne azonosítani, amelyek képesek vértképző sejtek létrehozására is, ám ezek a vértképző sejtek valójában egy másik, különálló sejtpopulációból erednek, a hematopoetikus őssejtekből (HSC). Az előbbieken alapján az MSC-k úgy jellemezhetőek, mint nem-vértképző, multipotens őssejtek, amelyek képesek mind mesenchymalis, mind nem-mesenchymalis sejtvonalakká differenciálódni [118]. A mesenchymalis őssejteket elsőként Friedenstein és munkatársai írtak le, mint a csontvelőből létrehozható, *in vitro* a tenyésztőedény falához kitapadó, elnyúlt, fibroblasztszerű morfológiát mutató sejteket, melyek kolóniaformáló képességekkel rendelkeznek, *in vivo* a bőr alá ültetve pedig ektopikus csontot és csontvelői stromát tudnak létrehozni, amely képes a vértképzés támogatására. Megfigyelt tulajdonságaik alapján ezeket a sejteket Friedenstein fibroblaszt kolóniaformáló egységekként nevezte el (CFU-F, colony-forming unit fibroblast) [120], [121]. A legismertebb sejttípusok, amelyekbe a multipotens csontvelői MSC-k képesek differenciálódni *in vitro* az oszteoblasztok, adipociták, kondroblasztok (10. ábra). A sejtek differenciációja adipocitákká 1-metil-3-izobutilxantin, dexametazon, inzulin és indometacin kezelés, oszteoblasztokká dexametazon, β -glicerofoszfát és aszkorbát kezelés, kondroblasztokká pedig TGF- β és mechanikai stimulus hatására következik be [7]. Emellett az MSC-k differenciálódhatnak más mezodermális sejttípusokká, mint vázizom sejtek, simaizom, szívizom vagy endotél sejtek. Vázizom sejteket a Notch intracelluláris doménjének (NICD) gén transzfekciójával, valamint háromféle citokin kombinált felhasználásával lehet létrehozni, a simaizom sejtek TGF- β -val, a szívizom sejtek 5-

azacitidinnel és az endotél sejtek vaszkuláris endoteliális növekedési faktorról (VEGF) való kezelés hatására keletkeznek. Az MSC-ket lehet indukálni más csírvonalból származó sejtípusokká is (transzdifferentiáció) (10. ábra).

Az ektodermális vonalra példa az idegsejt, amely szintén gén bevitel és citokinek segítségével jön létre, valamint a perifériás idegsejt, amely β -merkaptotanol, retinolsav, forskolin, fibroblaszt növekedési faktor (FGF), vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) és heregulin alkalmazása során alakul ki. Az endodermális eredetű sejtek irányába megvalósuló differenciációra példa a máj- és a hasnyálmirigysejt. Az előbbinél hepatocita növekedési faktort (HGF), az utóbbinál vérlemezkéből származó lizátumot, retinolsavat, aktivint, glukagon-szerű peptidet és citokineket adnak a tenyésztő közeghez [122].



10. ábra – A mesenchymalis őssejtek (MSC-k) multipotenciálja. A csontvelői MSC-k képesek az önmegújításra (görbe nyíl), valamint a mezodermális sejtvonalak irányába differenciálódni (egyenes nyilak). Leírták az MSC-k transzdifferentiációs képességét ekto- és endodermális irányba is (szaggatott nyilak), ám ezek az eredmények *in vivo* ellentmondásosak. Forrás: [6]

Napjainkban már ismert, hogy hasonló tulajdonságokkal rendelkező sejtek nem csak a csontvelőből nyerhetők, az MSC-knek megfelelő sejtek gyakorlatilag bármilyen másik szervünkben, illetve szövetünkben megtalálhatók, mint izom, zsírszövet, máj, tüdő, köldökzsín, ízületi folyadék, keringési rendszer, fogbél és magzatvíz [123]. Azonban a legtöbb preklinikai és klinikai vizsgálatokhoz az MSC-k fő forrásaként továbbra is a csontvelő szolgál [118]. Mivel különböző forrásokból származó MSC-ket tanulmányoztak, az egyes

típusok között változatos proliferatív és differenciációs potenciált figyeltek meg. Az MSC-k azonosítását megnehezíti, hogy eddig még nem sikerült olyan markert vagy legalább egy viszonylag egyszerű markerkombinációt találni, amely egyértelműen elkülönítené ezeket a sejteket a belőlük származó, de már szűkebb differenciációs potenciállal rendelkező sejtektől. Emiatt egyelőre az International Society for Cellular Therapy (ISCT) ajánlása alapján elkészített minimum kritériumrendszer szolgál az MSC-k definiálására, miszerint humán mesenchymalis ősz- vagy stromasejtnek tekinthető minden olyan sejt, amely *in vitro* [124]:

- 1) standard kultúra körülmények között – azaz 10% borjúsavót tartalmazó médiumban – a tenyésztőedény falához tapadva képes növekedni és elnyúlt, fibroblasztszerű morfológiát mutat,
- 2) a CD105, CD73, CD90 markereket kifejezi sejtfelszínén, míg negatív a különböző vérsejtfejlődési sorokra és endotél sejtekre jellemző markerekre, úgymint: CD45, CD34, CD14 vagy CD11b, CD79 α vagy CD19 és HLA-DR,
- 3) képesnek kell lennie megfelelő körülmények között oszteoblasztok, adipociták és kondroblasztok létrehozására.

Terápiás szempontból kiemelkedő tulajdonságai miatt az MSC-k hatalmas potenciált mutatnak számos betegség kezelésére, beleértve mind az immunológiai, mind a nem-immunológiai rendellenességeket. Bár az MSC-ken alapuló terápiák szabályozásához szükséges egységes mechanizmust még nem fedezték fel, a rendelkezésre álló adatok számos olyan működési modellt tártak fel, amelyek hozzájárulnak a kedvező hatások kialakulásához. Az előbb említett kiemelkedő tulajdonságok közé sorolható a sejtek differenciációs képessége többféle sejtvonal irányába, a sejt túlélése és proliferációja szempontjából létfontosságú szolubilis faktorok szekréciója, az immunválaszok szabályozása, valamint a sérült területek felé történő vándorlás [125]. Több évvel ezelőtt került sor az első klinikai vizsgálatra, amelynek során egy non-Hodgkin limfómában szenvedő beteget kezeltek csontvelői sejtekkel. Ezt később számos kísérlet követte, amelyekben az MSC-alapú terápiák megvalósíthatóságát és hatékonyságát tanulmányozták. Jelenleg több ezer olyan betegnél alkalmaztak allogén vagy autológ MSC-kkel végzett kezeléseket, akinél GVHD-t (graft-versus-host disease), hematológiai malignitásokat, keringési rendellenességeket, idegrendszeri betegségeket, autoimmun betegségeket diagnosztizáltak, szervátültetést végeztek, nem gyógyuló sebeket szereztek vagy csont és porc defektusokkal rendelkeztek [126], [127]. A különböző tanulmányok felvetették annak a lehetőségét, hogy az MSC-k infúziója elősegítheti a szervek és szövetek regenerációját úgy, hogy ezeknek a sejteknek a célszövet sejtjeivé történő

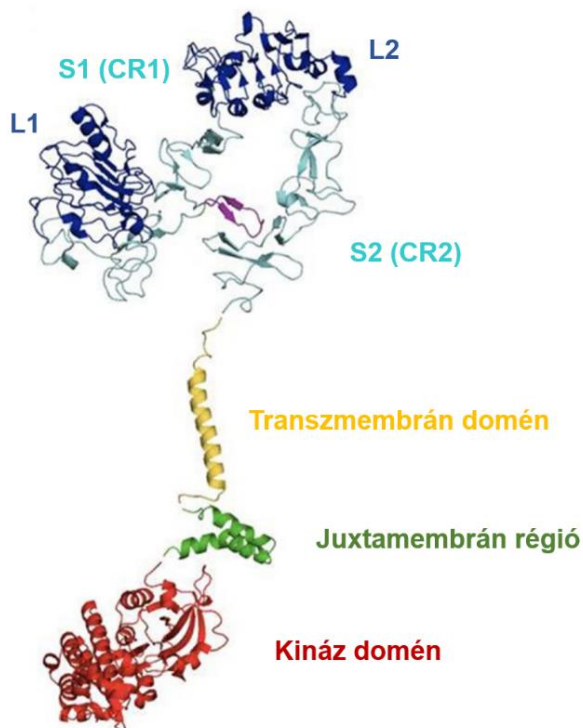
differentenciációját előidézve a sérült sejtek helyébe léphetnek. A kísérletek során megfigyelték, hogy a rendszeres befecskendezést követően a szervezetbe juttatott MSC-k először az erekkel dúsan átszőtt szövetekben, különösen a tüdőben, akadnak meg majd egy részük a gyulladt, sérült szövetekből felszabaduló kemokineket követve az érintett helyre vándorol és elősegíti a regenerációt. A technológia fejlődésének köszönhetően azonban hamar kiderült, hogy a donor eredetű MSC-k nem épülnek be és viszonylag gyorsan eltűnnek a recipiens szervezetéből (24 órás felezési idő), pozitív hatásukat ehelyett rövid idő alatt, parakrin faktorok, például citokinek, termelése által fejtik ki [128], [129]. Több eredmény is utal arra, hogy az MSC-k által termelt biológiailag aktív faktorok a közelükben lévő sejteknél megakadályozhatják az apoptózist, stimulálhatják a proliferációt, valamint elősegíthetik a sérült szövetek gyógyulását [130].

Az MSC-k terápiás haszna tehát egyrészt annak köszönhető, hogy a szöveti sérülés jeleire válaszul regenerációt segítő növekedési faktorok egész sorát képesek termelni, ilyen például az epidermális növekedési faktor (EGF), a fibroblaszt növekedési faktor (FGF), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), a transzformáló növekedési faktor-béta (TGF- β), a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), hepatocita növekedési faktor (HGF), inzulinszerű növekedési faktor (IGF) vagy az angiopoietin-1 (Ang-1) [131]. Terápiás szempontból másik kiemelkedő tulajdonságuk, hogy képesek az immunrendszer sejtjeivel olyan molekuláris kommunikációt folytatni, aminek végeredményeként a gyulladásos és autoimmun folyamatokat fenntartó sejtek túlsúlya mérséklődik, és a gyulladásgátló (regulátor), valamint a szövetregenerációt segítő immunsejtek jutnak nagyobb szerephez a beteg szövetekben. A jelenlegi adatok szerint az MSC-ken alapuló klinikai vizsgálatok nagy része még csak a korai fázisokig jutottak el (I/II vagy II-es fázis), amely alapján az MSC-k hatékony, biztonságos és hosszú távú terápiás alkalmazásához további kutatások szükségesek [125].

3.6 Az EGF jelátviteli útvonal jellemzői

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) az egyik leginkább vizsgált receptor tirozin kináz, amely az alapvető sejtes folyamatok széles körében érintett, mint a proliferáció, differenciáció, adhézió, túlélés és migráció [8]. Továbbá, különböző daganatos betegségek kialakulásában is részt vesz, ezekre példa a glioblasztóma, a nem-kissejtes tüdő daganat, a fej-nyak daganatok és a vastagbél daganatok [132]. Az ERBB receptor tirozin kináz család négy homológ tagból áll: EGFR (más néven ERBB1 vagy HER1), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) és HER4 (ERBB4). A receptorcsalád minden tagja rendelkezik egy citoplazmatikus tirozin kináz doménnel, egy juxtamembrán régióval, egy transzmembrán doménnel, ami alfa-hélix

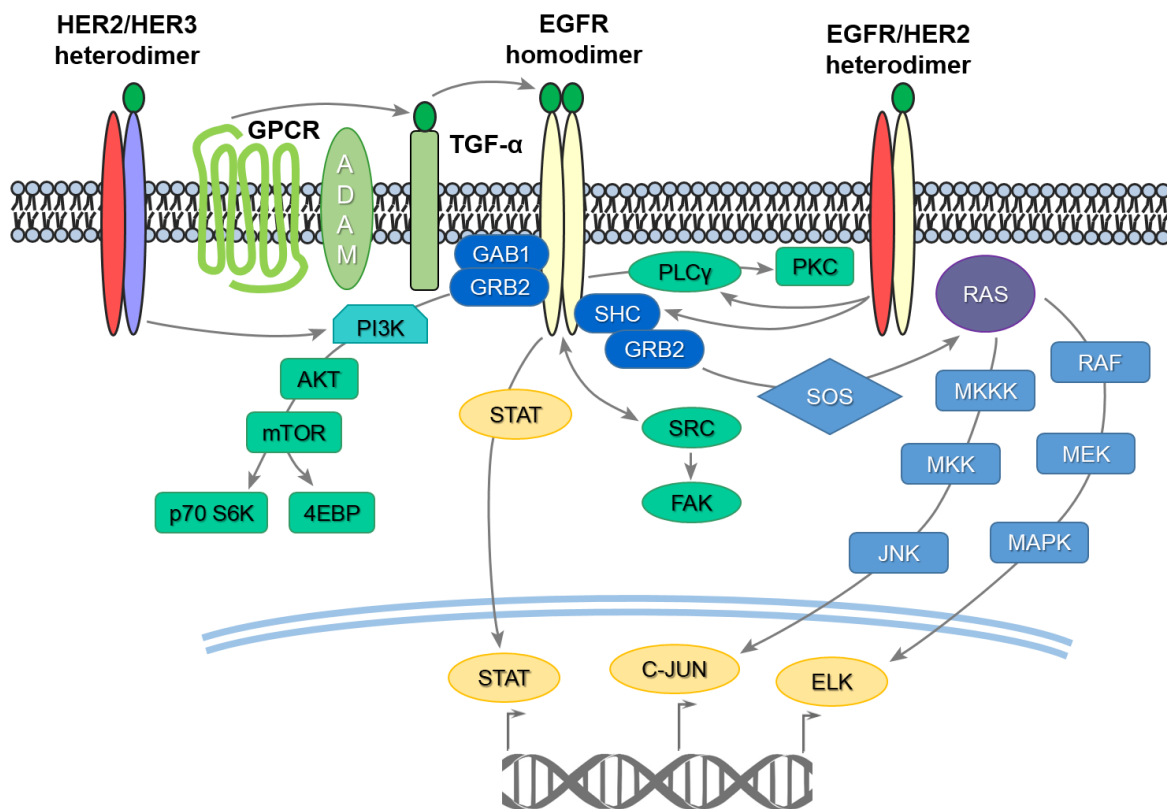
formájában egyszer fűrja át a membránt, valamint egy glikozilált, extracelluláris ligand-kötő doménnel, mely négy további kisebb aldóménre (L1, S1 (CR1), L2, S2 (CR2)) osztható (11. ábra). Az S1 és S2 ciszteiben gazdag (CR) homológ régiók, míg az L1 és L2 alegységek a ligand-kötő helyet alkotják [133]. A szöveti homeosztázis fenntartásához elengedhetetlenek a növekedési faktorokhoz kötött jelpályák. A megfelelő ligandumokat kialakító enzimek aktivációja, valamint a sejtmembrán közelében lévő jelátviteli modulátorok és foszfatázok járulnak hozzá az EGF:EGFR jelpálya rendszer többszintű szabályozásához.



11. ábra – Az EGFR szerkezete. A monomer receptor extracelluláris része négy doménből áll: az L1 és L2 ligandum kötő domének (sötétkék), S1 és S2 ciszteiben gazdag domének (világoskék). Az S1 domén tartalmazza a dimerizációhoz szükséges régiót (lila). Ezeket követi egy egyszeres hélix alkotta transzmembrán domén (sárga), egy juxtamembrán domén (zöld), valamint egy citoplazmatikus tirozin kináz domén (piros). A kináz domént követően a receptor rendelkezik egy C-terminális farki régióval, amely számos foszforilálódó tirozint tartalmaz. PDB kódok és Forrás: [134]

Az EGFR család ligandumai közül elsőként az EGF-et fedezték fel, majd később 12 homológ ligandumot azonosítottak, amelyek a TGF- α , amphiregulin (AREG), epiregulin (EREG), betacellulin (BTC), heparin-kötő EGF-szerű növekedési faktor (HB-EGF), epigen (EPGN) és a neuregulinok különböző izoformái (NRG). A felsorolt ligandumok a receptor család egy vagy akár több tagjához is tudnak kötődni, valamint a neuregulinok kivételével képesek közvetlen kapcsolatot kialakítani az EGF receptorral [135]. A kötődés alapján három csoportba oszthatóak: nagy affinitású ligandumok (EGF, TGF- α , HB-EGF, BTC), kis affinitású ligandumok (AREG, EREG, EPGN) és a neuregulinok. A ligandumok kötődése nélkül az EGFR-család nem termel elegendő tirozin kináz jelet a sejt folyamatok aktivációjához, valamint a receptorok kináz aktivitását nyugvó sejtekben tovább csökkenti a jelenlévő számos tirozin foszfatáz [132]. A stimulációt kiváltó ligandumok először transzmembrán prekursoroként szintetizálódnak, majd ezekből a sejt felszínén lévő metalloproteázok proteolízissel állítják elő a megfelelő szolubilis molekulákat, és az így keletkezett faktorok az EGFR homo- vagy

heterodimerizációját és tirozin kináz aktivitását idézik elő [136]. Újabban vannak olyan feltételezések, amelyek alapján a ligandumok az eleve dimer állapotú EGFR-hez kötődnek és az előidézett allosztérikus változások által szabályozzák a receptorok működését [137]. A receptor aktivációja a citoplazmatikus farki végen elhelyezkedő hat tirozin aminosav foszforilációjához vezet. Mivel az aktív receptor dimer egyik tagjának kináz doménje foszforilálja a másik tag tirozinjait és fordítva, ezért ezt a folyamatot transz-autofoszforilációnak is nevezik. Ezek a foszforilált tirozinok SH2 (Src homology 2) vagy PTB (phosphotyrosine binding) doménnel rendelkező fehérjéket képesek megkötni. Ezek közé tartoznak adapter- és állványfehérjék, mint az Shc, Crk, Grb2, Grb7 és Gab1; kinázok, mint például Src, Chk, PI3K, a protein tirozin foszfatáz SHP1 és SHP2 vagy például a PLC γ 1 enzim [138]. A toborzás során megkötött fehérjék indítják meg a sejten belüli jelátvitelt a különböző útvonalakon keresztül (12. ábra).



12. ábra – Az epidermális növekedési faktor (EGF) receptor családdhoz köthető jelpályák részleges ábrázolása. Az EGFR család, más néven ERBB receptor család, négy különböző tagból áll: EGFR, HER2, HER3 és HER4. Több ligandumot is azonosítottak már, amelyek különböző affinitással kötődnek a receptorokhoz. A ligandum kötődése stabilizálja az eltérő homo- és heterodimer receptor kombinációkat, elősegítve ezzel az intracelluláris kináz domének megfelelő közelségét. A receptor transzaktivációja a további jelátviteli folyamatok beindításához vezet, amely végül a sejtciklust, a szöveti homeosztázist, a túlélést és az inváziót szabályozó gének transzkripcióját eredményezi. Forrás: [139]

Az egyik különösen fontos, EGFR által aktivált útvonal a Ras/Raf/mitogén aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád, amely szabályozza a transzkripciót, sejtciklust (G1-S fázis

átmenet), proliferációt [140]. Az EGFR dimerizációját, majd foszforilációját követően a receptor a specifikus dokkoló motívumai segítségével közvetlenül, vagy az Shc adaptorfehérjén keresztül, komplexet képez a Grb2 adaptor és a Sos guanidin nukleotid kicserélő faktor fehérjékkel. Ez a kölcsönhatás a Sos plazmamembránhoz való transzlokációjához, illetve konformációjának megváltozásához vezet, amely így képessé válik a Ras-GDP megkötésére és a Ras-hoz kötött GDP GTP-re történő cseréjének elősegítésére. A Ras-GTP egyik célfehérjéje a Raf kináz, melynek aktiválódása az MEK fehérjén keresztül a MAPK (ERK1 és ERK2) foszforilációját és a sejtmagba történő transzlokációját eredményezi. Az aktivált MAPK a proliferációhoz szükséges specifikus transzkripciós faktorokat foszforilálja a sejtmagban [141], [142].

Egy másik fő útvonal a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K)/Akt/mTOR jelátviteli kaszkád, amely a sejt növekedésben, a túlélésben (apoptózis gátlásában) és mozgásában játszik szerepet [140]. Az EGFR család tagjaiban, a PI3K-ban, az AKT-ban bekövetkező aktivációs mutációk miatt a jelpálya túlműködése gyakran a daganatos megbetegedések kialakulásához vezet. A PI3K egy dimer enzim, amely egy szabályozó (p85) és egy katalitikus (p110) alegységből áll. A p85 az ERBB receptorok (elsősorban ERBB3) dokkoló helyéhez kötődik, míg a p110 felelős a másodlagos hírvivő PI(3,4,5)P₃ előállításáért, amely kiváltja az AKT kináz membránhoz való lokalizációját, foszforilációját és aktivációját. A stimulációt követően a PI3K megkötése különbözik az ERBB család egyes tagjainál, mivel az ERBB3 és ERBB4 közvetlenül, míg az ERBB1 és ERBB2 csak közvetetten képes megkötni a kinázt. A másik két taggal ellentétben az ERBB1 és ERBB2 nem rendelkezik a p85 megkötéséhez szükséges motívumokkal, így az indirekt kölcsönhatást esetükben a kanonikus p85 kötőhelyekkel rendelkező Gab1 (Grb2-asszociált kötő fehérje) dokkoló fehérje teszi lehetővé [141], [142].

Az EGF stimulus hatására a foszfolipáz C γ (PLC γ) képes közvetlenül interakcióba lépni az aktivált EGFR-el, valamint a plazmamembránban található PI(3,4,5)P₃-hoz is tud kötődni. A PLC γ foszforiláció útján válik aktívvá, amelynek következtében az enzim a PI(4,5)P₂ hidrolízisével inozitol-1,3,5-foszfátot (IP₃) és 1,2-diacylglicerolt (DAG) állít elő. Az IP₃ az endoplazmatikus retikulum felszínén lévő IP₃-receptorokhoz kötődik, indukálva az intracelluláris Ca²⁺ felszabadulását. A Ca²⁺ felszabadulás és a DAG keletkezés hatása átfed, ugyanis mindkét másodlagos hírvivő a protein kináz C-t (PKC) aktiválja. A PKC-nek szubsztrátja az EGFR is, ám az így bekövetkező foszforiláció gátolja a receptor EGF által kiváltott aktivációját (negatív feed-back mechanizmus). Egy másik szubsztrát a foszfolipáz D (PLD), amely a kiterjedt EGFR jelátviteli hálózatban tölt be szabályozó szerepet. A PLD a

foszfatidilkolint foszfatidsavvá és kolinná hidrolizálja, amelyek kölcsönhatásba léphetek más útvonalakhoz tartozó fehérjékkel, mint a Raf, Rac, vagy mTOR [142].

Fontos megemlíteni az Src tirozin kinázt is, amelyről régóta ismert, hogy részt vesz az EGFR jelpályában. Már évekkel ezelőtt megállapították az EGF által indukált mitogén sejtválaszokban az Src és EGFR szinergikus szabályozó szerepét [143]. Később kimutatták, hogy az Src és az EGFR olyan komplexet képez, amely megnöveli a receptor tirozin foszforilációját és az együttműködésük fontos a sejtek transzformációja és a daganatok kialakulásának szempontjából [144]. Az EGFR több, nem autofoszforilációs helyen található tirozinjáról is megállapították, hogy az Src szubsztrátja, ilyen az Y845, az Y891, az Y920 és az Y1101. Az Src-függő foszforiláció új, a receptor EGF általi aktivációjától eltérő jelátviteli lehetőségeket biztosít. Az Src hatására az EGF-indukált mitogén válaszok fokozódnak, azonban a receptorban található Y845 Src-foszforilációs hely mutációja nincs hatással az EGF által előidézett kináz aktivitásra és MAPK jelátviteli kaszkád működésre. Viszont az Y845 foszforilációja közvetlenül szabályozza a STAT (signal transducer and activator of transcription) fehérjék aktivációját [145]. A STAT transzkripciós faktorok dimert képeznek, transzlokálódnak a sejtmagba, ahol befolyásolják a gén expressziót [146]. Az Src-függő foszforiláció feltételezhetően az EGFR transzaktivációjában játszik fontos szerepet úgy, hogy az EGF receptorok további ligandum kötés nélkül egymásnak továbbítják, vagy egy másik receptortól, például G-fehérje kapcsolt receptorok, veszik át a jelet [142], [145]. Sato és munkatársai szerint az alábbi molekuláris mechanizmus feltételezhető az Src és EGFR között: (1) az EGF extracelluláris kötődése elősegíti a receptor kináz doménjének konformációs megváltozását; (2) az Y845 szabaddá válik az EGFR kináz domén felületén; (3) az Src hozzáfér és foszforilálja az Y845-öt; (4) a foszforilált Y845 és a körülötte lévő aminosav szekvencia dokkoló felületként szolgál az Src SH2 doménjének, vagy más fehérjék PTB doménjének, lehetővé téve a fizikai kapcsolatot a receptor és a jelátviteli molekulák között [147].

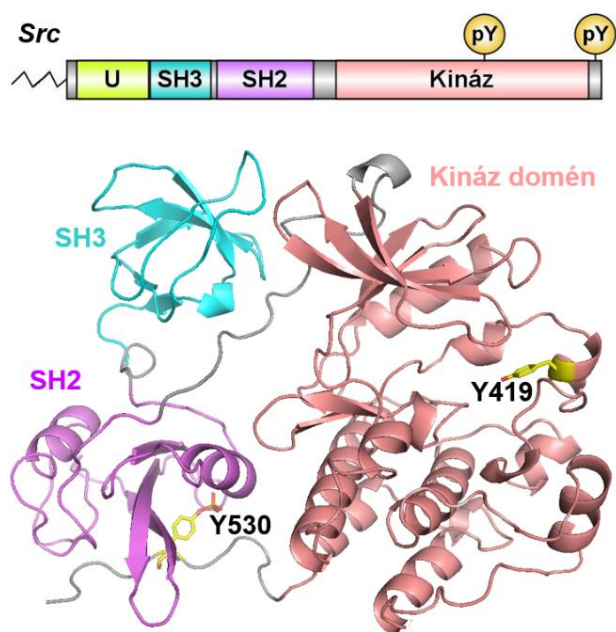
Az interakció az ERBB receptorok és a tőlük független jelátviteli útvonalak között több különböző mechanizmuson keresztül valósulhat meg, amely lehetővé teszi az útvonalak kombinatorikus aktiválódást és a sejtválaszok változatosságát. Mivel az EGFR rendellenes aktivitása összefüggésben áll a szabályozhatatlan sejtosztódással és túléléssel, így a daganatos megbetegedések kezelésében a jelpályához kapcsolódó komponensek ígéretes célpontok lehetnek [139].

3.7 Src tirozin kináz

Az Src nem-receptor tirozin kinázt már évtizedek óta intenzíven tanulmányozzák, mivel rendellenes működése hozzájárul a sejt transzformáció és az karcinogenezis kialakulásához. Az Src és az Src családba tartozó többi kináz különböző sejtes folyamatokban vesz részt, mint az apoptózis, a sejtosztódás, a migráció, a citoszkeleton átrendeződése, a differenciáció, az immunválasz, az idegrendszer működése és a transzkripció [148]. Az Src tirozin kináz család 11 tagból áll, melyeket három csoportba osztottak: (I) a négy egymással közeli rokonságban álló enzim: Fgr, Fyn, Src és Yes; (II) következő négy tag: Blk, Hck, Lck és Lyn; (III) az I-es és II-es csoporttól távolabbi rokonságban álló enzimek: Brk, Frk és Srm [149]. Az Src, Fyn és Yes kinázok minden sejtípusban expresszálódnak, míg a Blk, Fgr, Lck és Lyn elsősorban a hematopoetikus sejtekben fejeződnek ki. A III-as csoportba tartozó enzimek közül az Srm a keratinocitákban, az Frk leginkább a hólyag-, agy-, vastagbél- és nyiroksejtekben, a Brk pedig főként a prosztata, vékonybél és szintén a vastagbél sejteiben található meg. Az Src volt az első tagja a családnak, emellett a v-Src homológja, amely a Rous szarkóma egyik okozója [150].

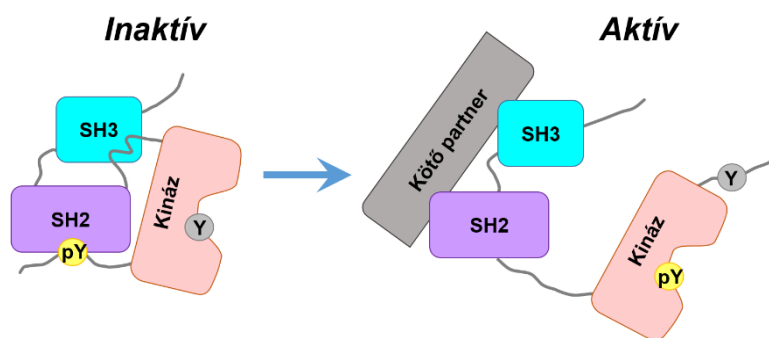
A humán *SRC* gén által kódolt kináz 536 aminosavból áll. Az N-terminális végén lévő metionin hidrolízise után szabaddá vált glicin szükséges az Src mirisztoilációjához, amely biztosítja a kináz membránhoz kötődését [151]. A PKA (protein kináz A) katalitikus alegysége és az Abl nem receptor tirozin kináz szintén tartalmaz mirisztoil-csoportot, ám ezek nagyrészt a citoszolban maradnak, amely arra utal, hogy ez a poszttranszlációs módosítás önmagában még nem feltétlenül elegendő a membrán lokalizációhoz [152], [153]. A mirisztoilációs helytől C-terminális irányba egy nem konzervált egyedi (unique) domén, egy SH3 domén, egy SH2 domén, egy SH1 kináz domén, egy az SH2 és SH1 doménokat összekötő linker, valamint az SH1-et követően egy konzervált szabályozó régió található (13. ábra) [154].

Az Fgr, Fyn, Lck és Src kinázok esetében kimutatták, hogy az SH2 domén által preferált foszfortirozint tartalmazó kötő motívum a pY-E-E-I [155]. Az Src két rendkívül fontos szabályozó foszforilációs helyet tartalmaz, amelyek közül az egyik a kináz C-terminális végén lévő 530-as tirozin (Y530). Ez a tirozin alap állapotban foszforilált, amely leginkább a Csk-nak (C-terminális Src kináz) köszönhető, és intramolekulárisan kötődik az Src-SH2 doménhoz, stabilizálva ezzel az enzim zárt konformációját [156]. Az Y530F mutáns enzim jóval aktívabb a vad típusúhoz képest és indukálja a tumoros sejtek növekedését [148].



13. ábra – Az Src sematikus ábrázolása és kristályszerkezete. A kináz az N-terminális végétől haladva tartalmaz egy mirisztoilációs motívumot (cikk-cakk vonal), egy egyedi domént (világoszöld), egy SH3 (világoskék) és SH2 (lila) fehérje-interakciós domént és egy kináz domént (halvány rózsaszín). A kináz doménben a 419-es pozícióban, illetve a C-terminális végén az 530-as pozícióban található két tirozin foszforilációs állapota kulcsfontosságú a kináz működése szempontjából (sárga). (PDB: 2SRC) Forrás: [155]

Fontos megemlíteni, hogy az SH2 és SH1 domének közötti összekötő szakasz tartalmaz egy prolinban gazdag régiót, amely az Src-SH3-hoz kötődésével szintén hozzájárul a negatív szabályozáshoz. A partnerek kötődése az Src SH2 és SH3 doménjéhez megszünteti az előbb említett intramolekuláris interakciókat, amelyek az enzim inaktivitásáért felelősek. [157]. A másik fontos foszforilációs hely a 419-es tirozin, amely az aktivációs folyamat során autofoszforilálódik, ezzel elősegítve és stabilizálva a kináz aktív állapotát [158]. Összegezve az Src aktivitását több tényező befolyásolja, mint az Y530 defoszforilációja (PTP- α , protein tirozin foszfatáz által) vagy mutációja, az SH3- és SH2-mediált intramolekuláris interakciók helyett nagyobb affinitású ligandumok kötődése, valamint a Y419 autofoszforilációja (14. ábra).



14. ábra – Az Src aktivációja. Inaktív állapotban a kináz C-terminális végén található foszforilált Y530 kötődik az Src saját SH2 doménjéhez, valamint az SH3 domén kölcsönhatásba lép az SH2 és kináz domén közötti prolinban gazdag régióval, amelyek stabilizálják az enzim autoinhibált konformációját. A kötődő interakciós partner feloldja ezeket az intramolekuláris kölcsönhatásokat, melynek következtében az aktiválódó enzim konformációja kinyílik. Az aktiváció során az Y530 foszforilációja megszűnik, emellett az optimális aktiváció eléréséhez az Y419 autofoszforilálódik. Forrás: [157], [158]

Az Src család tagjai ugyan nem kerülnek közvetlen kapcsolatba a sejten kívüli jelátviteli molekulákkal, mégis kulcsfontosságú komponensei az extra- és intracelluláris szignálokra adott sejtes válaszoknak. Az Src szerepe a jelátviteli útvonalakban meglehetősen bonyolult, hozzájárul többek közt a transzmembrán receptor tirozin kinázok (RTK) és a G-fehérje kapcsolt receptorok működéséhez [149].

Az Src olyan receptor tirozin kinázok jeltovábbításban vesz részt, mint a kolónia stimuláló faktor-1 receptor (CSF-1R), az EGFR, az ERBB2, az FGFR, a HGFR, PDGFR, valamint az inzulin-szerű növekedési faktor-1 és 2 receptorok (IGF1/2-R) [154]. A jelátvitel során az információ áramlása kétirányú, mivel az Src foszforiláció vagy fehérje-fehérje kölcsönhatás útján is szabályozhatja a receptor tirozin kinázok aktivitását, valamint a receptorok aktivációja szintén eredményezheti az Src foszforilációját és aktiválódását. Az Src-SH2 kötődése a receptorhoz szabaddá teszi a foszforilált Y530-at, lehetőséget nyújtva ezzel a foszfatázoknak a foszforil-csoport eltávolítására és így a további aktivációra. Az EGFR és Src közötti kapcsolatról az előző fejezetben már esett szó. Az Src aktivitására a PDGFR-el és az ERBB2-vel való kapcsolat is hatással van, ugyanis a receptor képes az Src-t a 216-os pozícióban lévő tirozinon foszforilálni, amely az SH2 doménen belülrre esik, így megakadályozva az intramolekuláris kölcsönhatást, abban az esetben is, ha az Y530 foszforilált. A PDGFR továbbá az Src 141-es tirozinjának foszforilációját is katalizálja, amely az SH3 doménben történik, azonban ennek a hatása még nem ismert [159]. Az Src család tagjai különböző módon segítik elő a növekedési faktor receptorok jelátvitelét, beleértve a DNS szintézishez szükséges útvonalakban való közvetlen részvételt, a sejtfelszíni receptorok szabályozását, az aktin citoskeleton változásainak irányítását, valamint a sejtmozgás és túlélés támogatását [160].

Számos tanulmány kimutatta, hogy a GPCR-ek ligandum-függő vagy -független mechanizmusokon keresztül képesek aktiválni az Src-t és indukálják a kináz szubsztrátjainak foszforilációját [161]. Az Src, illetve az Src család tagjainak GPCR általi aktivációja alapvetően kétféle módon jöhet létre: (1) a kináz közvetlen asszociációja a GPCR-hez vagy egy receptorhoz kötött fehérjéhez, valamint (2) a GPCR-ek által közvetített jelek kiváltják a RTK-k transzaktivációját, amelyek ezt követően a kinázok felé továbbítják a jelet. A GPCR aktivációja előidézi az arrestin szabályozó fehérje toborzását, amely szabályozza az Src kináz aktivitását, valamint meghatározza a jelátvitel idejét és a szubsztrát specifitást [149], [160].

Az Src interakciós partnerei közé tartozik a fokális adhézíós kináz (FAK) is, amely a fokális adhézíó modulációján keresztül kulcsfontosságú szereplője az áttétes daganatok kialakulásának [162]. A fokális adhézíók dinamikus sejten belüli struktúrák, amelyek az

integrinek segítségével összekötik az extracelluláris mátrixot (ECM) az aktin citoszkeletonnal [163]. A FAK, mint a fokális adhézió egyik komponense, több másik sejtfehérjével is kölcsönhatásba lép, így átalakítva az integrinektől érkező jeleket a sejtek mozgásához és inváziójához. A daganatok esetében a sejtek fokozott mozgása és osztódása összefüggésben áll a kináz magas expressziós szintjével [162], [164]. Már ismert, hogy az ECM fehérjék és az integrinek összekapcsolódását, illetve az EGF vagy PDGF receptorok ligandum kötését követően a FAK és Src kináz tranziens és aktív komplexet képeznek. Ezek a sejtfelszíni molekulák interakcióba lépnek a FAK N-terminális részével a kináz autofoszforylációját eredményezve, amely előidézi az SH2 doménnel rendelkező jelátviteli komponensek toborzását [165]. Az Src és FAK asszociációja az Src aktivációját és több pozícióban a FAK foszforylációját váltja ki. Utóbbi megnöveli a FAK kináz-aktivitását, valamint dokkoló helyeket biztosít a Grb2 és egyéb jelátviteli fehérjék számára. A FAK-Src komplex szintén foszforylálja a citoszkeletonális adaptor fehérjéket, a paxillint és a Cas-t. Az így összeállt fehérjék együtt toborozzák és aktiválják az ERK, a JNK és a Rho jelátviteli útvonalak szabályozó molekuláit, ezáltal befolyásolva a sejtmozgáshoz és invázióhoz szükséges transzkripciós faktorok és célfehérjék génexpresszióját [165]. A különböző farmakológiai inhibitorokkal, homozigóta delécióval és menekítéssel végzett kísérletek bizonyítják az Src és FAK közötti kapcsolat fontosságát az előbb említett sejtes folyamatokban [166].

Az Src interakciója a különböző útvonalakkal rendkívül bonyolult és nem teljesen ismert. Az Src családba tartozó kinázok szerepének felderítése a humán daganatos megbetegedésekben folyamatosan fejlődik, valamint számos daganat típus esetében beszámoltak a kináz fokozott aktivációs szintjéről, így az Src gátlása a terápiák egyik fő célpontjává vált.

4 CÉLKITŰZÉS

Már kimutatták, hogy a Tks4 különböző folyamatokban vesz részt, például podoszómák létrehozása vagy reaktív oxigén származékok termelése, valamint hiányához köthető a Frankter Haar szindróma (FTHS) kialakulása. Mivel a betegség által érintett szövetek főként mesenchymalis eredetűek, így a mesenchymalis őssejtek zavara a Tks4 eddig még nem ismert funkciójára utal. Először ennek a tanulmányozásához az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Hogyan jellemezhető a Tks4-hiányos egér?
2. A csontvelőből izolált sejtekből sikerült-e létrehozni MSC kultúrákat?
3. A Tks4 hogyan befolyásolja az MSC-k csont irányú differenciációját?
4. A Tks4 hogyan befolyásolja az MSC-k zsír irányú differenciációját?

A csoportunk korábbi eredményei szerint EGF stimulus hatására a Tks4 az Src tirozin kináz jelenlétében komplexet képez az aktivált EGF receptorral, azonban az interakció kialakulásának háttere és mechanizmusa ismeretlen volt. Így a továbbiakban ennek felderítése érdekében célunk az alábbi kérdések megválaszolása volt:

5. A Tks4 szekvenciájában milyen Src-re specifikus kötőmotívumok találhatóak?
6. Mi a Tks4 és Src közötti interakció molekuláris mechanizmusa?
7. Hogyan jellemezhető a Tks4 és Src közötti kapcsolat?

5 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Tks4-hiányos egér előállítása

A kondicionálisan Tks4-hiányos egereket laboratóriumunk számára a TaconicArtemis vállalat állította elő a 11-es kromoszómán található *SH3PXD2B* gén módosításával. A célzó vektorban az 5-ös és 6-os exonokat loxP helyekkel határolták, valamint a pozitív szelekcióhoz egy puromicin rezisztencia gén kazettát illesztettek a 4-es exon után, közel a kihasítani kívánt exonokhoz. Negatív szelekció céljából a 6-os exont követő loxP hely mellé a timidin kináz génje került.

A C57Bl/6 embrionális őssejtvonalat mitotikusan inaktivált, egér fibroblasztokat tartalmazó rétegen növesztették 20% FBS-t (fetal bovine serum), 1200 egység/ml leukémia inhibitor faktort és magas koncentrációban glükózt tartalmazó DMEM-ben (Dulbecco's Modified Eagle Medium). A linearizált DNS vektort elektroporációval jutatták be a sejtekbe, majd 2 nap elteltével megkezdődött a puromicin szelekció, 5 nap elteltével pedig a negatív szelekció Ganciklovir hozzáadásával. Az embrionális őssejt klónokat a 8. napon izolálták és Southern blot technikával analizálták. Az így létrehozott, loxP helyekkel határolt 5-ös és 6-os exonokat hordozó, kondicionális génkiütött egér keresztezése a Cre rekombinázt hordozó egérrel eredményezte az utódokban a Tks4-et kódoló gén mutációját, amely a fehérje hiányához vezetett. A genotipizálást PCR technikával végeztük, a vad típus (wild type, WT) esetében a1 és s1 (a1: ACC CCA TAT CCA AAT TGT TGG és s1: GGA TAC ATT ATG CTG GCA TCG), a génkiütött (knock out, KO) esetében a1 és s2 (s2: GGT TTG AGT GAC AGG TAT CAA CC) oligonukleotid primerek felhasználásával. A WT-hez és a KO-hoz tartozó PCR termékek 249, illetve 329 bázispár (bp) hosszúak.

Az *SH3PXD2B* gén inaktiválását minden generációban a genomiális DNS-en végzett PCR-el ellenőriztük. Az állatokon végzett kísérletek az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács hozzájárulásával történtek.

5.2 Csontvelői MSC kultúrák előállítása és karakterizálása

A vad típusú és Tks4-hiányos csontvelői MSC kultúrák előállítása 10-12 hetes egerekből történt. Az altatást követően a kiemelt combcsontokat és sípcsontokat Hank's puffert (Hank's balanced salt solution, HBSS) tartalmazó Petri-csészékben gyűjtöttük. Miután a csontokat megtisztítottuk a szövetmaradványoktól és az ízületek eltávolításra kerültek, a csontvelőben megtalálható sejteket komplett médiummal (complete medium, CM) fűjtük ki. A kifűjáshoz

használt médium 10% magzati borjúsérumot, 5% ló sérumot, 50 U/ml penicillint, 50 µg/ml streptomycint és 2 mM L-glutamint tartalmazó DMEM/Ham's F-12 médium volt heparinnal kiegészítve, melynek végkoncentrációja 5 U/ml. A sejtszuszpenziót kétszer mostuk Hank's pufferrel, majd $1-2 \times 10^5$ sejtet tettünk ki CM-mel feltöltött 25 cm²-es sejtenyésztő flasksba és 37 °C-on, 5% CO₂ mellett inkubáltuk. Két nap múlva a nem letapadt sejteket a médium cseréjével távolítottuk el, majd a megmaradt sejteket a teljes konfluencia elérése után 75 cm²-es tenyésztő edényekben növesztettük tovább. A kísérletek 4 és 11 közötti passzázs-számú sejtek felhasználásával történtek.

A létrehozott MSC kultúrákat a sejtfelszíni markerek segítségével karakterizáltuk áramlási citometriával (fluorescence activated cell sorting, FACS) a 3., 6. és 9. passzázs követően. Az analizált szuszpenziók 1×10^5 sejtet tartalmaztak, melyeket 20 percig, 4 °C-on sötétben inkubáltuk fluoreszcein-izocianáttal vagy fikoeritrinnel konjugált Sca-1, CD44, CD73, CD90.2, CD45R és F4/80 monoklonális egér antitestekkel. Az itt használt antitesteket a BD Pharmingen és AbD Serotec vállalatoktól rendeltük. A mért fluoreszcencia adatokat a megfelelő izotípus kontrollokkal együtt ábrázoltuk.

5.3 Zsír és csont irányú differenciáció

A különböző differenciációs kísérletekhez WT és KO csontvelői MSC-ket kiraktunk 24-lyukú vagy 25 cm²-es sejtenyésztő edényekbe és komplett médiumban növesztettük őket (CM). A teljes konfluencia elérése után a CM-et a megfelelő differenciáltató médiumra cseréltünk vagy felvettük a nulladik napi kontroll mintát. A zsír irányú differenciáció során 10% magzati borjúsérummal (FBS), 0.5 mM 3-izobutil-1-metilxantinnal (IBMX) és 0.1 µM dexametazonnal kiegészített DMEM/Ham's F12 tenyésztő közeget használtunk adipogén differenciáltató médiumként (ADM). A csont irányú differenciációnál 10% FBS-t, 10 mM β-glicerofoszfátot, 50 µg/ml aszkorbinsavat és 0.01 µM hidrokortizont tartalmazó DMEM-et alkalmaztunk, mint oszteogén differenciáltató médium (ODM).

Az MSC kultúrákat 1-10 napon keresztül ADM-ben tartottuk, majd a lipid cseppek képződésének vizsgálatához a sejteket 8% formalinnal fixáltuk és Oil Red O-val, valamint dimetil-metilén kézzel festettük 20 percig 4 °C-on. Az oszteogén differenciáció 1-14 napig tartott és ebben az esetben az extracelluláris kalcium felhalmozódást követtük nyomon Alizarin Red S festéssel. A differenciációs potenciálokat adipogén esetben a festett kultúrákról készült fényképek elemzése alapján [167], oszteogén esetben a képek mellett OD mérésekkel határoztuk meg. Az Alizarin Red S festés után a száraz tenyésztő edényekbe 0.5 ml/lyuk

extrakciós oldat került, amely 20% (v/v) metanolt és 10% (v/v) ecetsavat tartalmazott. A kioldódott festéket tartalmazó oldatokból 100-100 µl-t 96-lyukú edénybe vittünk át, és ezeknek az optikai denzitását mértük 450 nm-en.

5.4 RNS izolálás, gén expressziós analízis

A vad típusú és génkiütött MSC-k génexpressziós vizsgálatához első lépésként a differenciáltatott sejtekből Nucleospin RNA kit segítségével RNS-t izoláltunk, a gyári leírás szerint. A genomiális DNS-sel való esetleges kontamináció elkerülése érdekében az izolációs oszlopokon lévő mintákat DNázzal kezeltük. A cDNS szintéziséhez 150 ng RNS-ből indultunk ki és a SuperScript kit-et használtuk, szintén a gyári leírásnak megfelelően.

Az egerek lipid-regulációs génjeire specifikus, 96-lyukú TaqMan Array tálcát alkalmaztuk a pontos génexpressziós mintázat meghatározásához. A kísérlet során ugyanazon a tálcán közvetlenül össze tudtuk hasonlítani a kontroll és a kezelt mintákat, valamint a tálcát párhuzamosan használhattuk a standardizáláshoz szükséges háztartási génekkel (aktin, GAPDH, HPRT1, GUSB) is. A differenciáltatott csontvelői MSC mintákon mért változásokat (hányszorosára nőtt vagy csökkent az expressziós szint) a nulladik napi kontroll minták eredményei alapján normalizáltuk. Az adatokat logaritmikus skálán ábrázoltuk és a géneket az alábbiak szerint csoportosítottuk: transzkripciós faktorok, szterol metabolizmust, zsírsav metabolizmust, lipid csepp kialakulást befolyásoló gének.

5.5 Pozitronemissziós tomográfia/mágneses magrezonancia képalkotás (PET/MRI)

A fehér zsírszövetekről további információk gyűjtéséhez a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetben készítettek számunkra NanoScan PET/MRI készülékkel méréseket. Az egereket az MRI készülékbe való behelyezése előtt izofluránnal altattuk el és nem alkalmaztunk kontraszt anyagot. A mérés során használt paraméterek: szkennelési tartomány 100 mm és 250 szelet, szeletvastagság 0.4, FOV 50, mátrix 128x128, NEX3, TR/TE/FA 4.4/1.5/60 FESS.

5.6 A Tks4 bioinformatikai analízise

A Tks4-en belüli lehetséges kötőhelyek felderítéséhez először szekvencia analízist végeztünk. A rendezetlen régiók jóslása IUPred-el [168] történt, ezt követően a prediktált szakaszokon belül az esetleges kötő motívumokat az ELM [169] segítségével kerestük meg. A

homológ Tks4 szekvenciákat a HOGENOM [170] adatbázisból töltöttük le, majd ezeket a szekvenciákat a MUSCLE [171] és a Weblogo 3.4 [172] segítségével összehasonlítottuk és ábráztuk. A humán Tks4-ben az ismert foszforilációs helyeket a PhosphoSitePlus [19] adatbázis alapján határoztuk meg.

5.7 Plazmidok és konstrukciók, irányított mutagenézis

[illegible]

A sejtes kísérletekhez QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit segítségével állítottuk elő az eredeti V5-jelölt Tks4-et tartalmazó pcDNA3.1/TOPO-V5-His vektorból a mutáns konstrukciót: V5-Tks4^{PRR_N-TTM_{mut}} (PSRRLPDAPH → PSASASDAPH és SAGYEEISDPDM → SAGFEEISDPDM), a gyári leírásnak megfelelően.

Az összes konstrukció előállításának sikerességét szekvenálással ellenőriztük.

5.8 Fehérje termelés és tisztítás

A His6 és GST címkével ellátott fehérjéket Rosetta (DE3) pLysS baktériumokban termeltettük. A baktériumokat a transzformálást követően ampicillin és kloramfenikol antibiotikumokat tartalmazó agar lemezekre leoltottuk és 37°C-on, egy éjszakán át hagytuk növekedni. Ezt követően a tenyészeteket szétosztottuk 4-szer 1 liter ampicillin tartalmú LB médiumba és 37°C-on rázattuk, amíg az OD értéke elérte a 0.5-öt. A fehérje expressziót 0,4 mM IPTG-val (izopropil- β -D-tiogalaktozid) indukáltuk és egy éjszakán keresztül 16°C-on

rázatra inkubáltuk. A tenyészeteket lecentrifugáltuk (4000 g, 20 perc, 4°C), majd a felülúszó leöntése után literenként 35 ml lízis pufferben (50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 3 mM NaN₃) homogenizáltuk az összegyűjtött baktériumokat. A szuszpenziókat lefagyasztottuk, majd a felolvasztást követően DNÁzzal kiegészítettük és szonikáltuk. Az így kapott lizátumokat ismét centrifugáltuk (20 000 g, 30 perc, 4°C) és a felülúszókat a GST fúziós fehérjék esetében közvetlenül a precipitációs kísérletekhez használtuk, míg a His6-jelölt fehérjék esetében Ni²⁺-gyantát tartalmazó kromatográfiás oszlopokon tisztítottuk. A His6 címke eltávolítása a fehérjék TEV-proteázzal való emésztésével történt. A termelt Src doméneket ioncserélő oszlopokon (HiTrapQ vagy HiTrapSP), a Tks4 fragmenseket C8-as reverz fázisú HPLC oszlopokon tisztítottuk tovább. A kísérletekhez felhasznált Tks4 darabok megfelelőségét tömeg spektrometriával ellenőriztük.

5.9 Foszforiláció

Az Src és Tks4 közötti interakció vizsgálatához szükségünk volt a Y508-on foszforilált Tks4 szakaszok előállítására. Ehhez az előállított és tisztított Tks4 fragmentumokat kináz pufferbe (20 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 10 mM MgCl₂, 0.01% Triton X-100, pH=7.6) oldottuk be és egy éjszakán keresztül foszforiláltuk az EphB1 kináz doménjével szobahőmérsékleten. A szubsztrát molárisan 50-szeres mennyiségben volt jelen a kinázhoz képest és a reakciót 100 mM ATP oldattal indítottuk úgy, hogy az ATP végkoncentrációja molárisan a szubsztrát 5-szöröse legyen. A foszforilált fehérjéket Proteomics SAX-NP3 HPLC oszlopon tisztítottuk és tömeg spektrometriával ellenőriztük a foszforiláció sikerességét.

5.10 COS7 sejtek fenntartása, transzfekciója és EGF stimulációja

Az értekezésben bemutatott kísérletek egy részét az ATCC-től rendelt COS7 sejtvonalon végeztük, melyet 10% magzati borjúsérummal és antibiotikummal (100 egység/ml penicillin, 50 µg/ml sztreptomycin) kiegészített DMEM-ben tartottuk fenn 37°C-os termosztátban, 5% CO₂ mellett. A különböző plazmidokkal való tranziens transzfekciót X-tremeGENE HP DNA transzfekciós reagens segítségével végeztük, a gyári leírás szerint. A transzfekciót megelőző napon 5x10⁵ számú sejtet ültettünk ki 10 cm átmérőjű Petri-csészére, szérumot tartalmazó DMEM-be. Másnap a gyártó által javasolt mennyiségben összemértük a transzfekciós elegyet, mely csészénként 10 µl X-tremeGENE HP DNA transzfekciós reagenst, 5 µg plazmid DNS-t és 500 µl OptiMEM-et tartalmazott. Az elegyet 15 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd hozzásepegtettük a sejtekhez. Legalább 24 óra elteltével a médiumot szérum

mentesre cseréltük, amely az EGF kezelés miatt volt szükséges, és egy éjszakát vártunk. A sejtek stimulációjához 50 ng/ml EGF-et használtunk, mellyel 10 percig inkubáltuk a sejteket 37 °C-on. Egyes kísérleteknél a kezelést követően az EGF lemosása érdekében a sejtekről leszívtuk a korábbi médiumot és helyette EGF és szérumszintmentes médiummal töltöttük fel a csészéket. A mikroszkópos kísérletekhez 20 000 db sejtet raktunk ki 12-lyukú, eltávolítható falú tenyésztő lemezekre és arányosan kevesebb reagenst használtunk a transzfekcióhoz és a stimulációhoz is.

5.11 Ellenanyagok

A monoklonális anti-V5 ellenanyag oldott (R960-25) és agaróz gyöngyökhöz kötött (A7345) formáját az Invitrogentől és a Sigma-Aldrichtől szereztük be. A foszfortirozin elleni monoklonális ellenanyagok (4G10/05-321) és az α -tubulin (T6199) elleni antitestek szintén a Sigma-Aldrichtől származtak. Az általunk használt monoklonális PPAR γ (81B8/2443), adiponektin (C45B10/2789), Src (2109) és az Src-pY418 (44-660G) ellenanyagok a Cell Signaling Technology és a ThermoScientific termékei. A RunX2 (ab76956) és Osterix (ab22552) elleni antitesteket az Abcam vállalattól rendeltük.

Másodlagos ellenanyagként immunoblothoz torna peroxidázzal konjugált anti-egér, illetve anti-nyúl antitesteket (GE Healthcare) alkalmaztunk.

A poliklonális Tks4 antiszérumszint laboratóriumunk számára egyedileg készítette a Thermo Fisher Scientific Inc. A Tks4 egy darabját (aminosavak: 23-430) GST-fúziós fehérjeként állítottuk elő és elküldtük a cég részére. A kiküldött fehérjével két nyulat oltottak be, majd az oltás előtti és utáni szérumszinteket visszaküldték.

5.12 Immunprecipitáció és western blot

A 25 és 75 cm²-es flaskákban tenyésztett MSC kultúrákat, vagy a 10 cm-es csészéken növekvő, előkészített COS7 sejteket jéghideg PBS-sel való mosás után 1 ml ún. harvest-pufferben tártuk föl, melynek összetétele: 30 mM Tris-HCl pH=7.5, 100 mM NaCl, 1% TritonX-100, 10 mM NaF, 1 mM EGTA, 2 mM p-nitrofenil-foszfát, 10 mM benzamidin, 25 μ g/ml Pepstatin A, 25 μ g/ml szója tripszin inhibitor, 25 μ g/ml aprotinin. A lízis pufferhez közvetlenül felhasználás előtt 1 mM PMSF proteáz gátlót és 1 mM Na₃VO₄ foszfataz gátlót adtunk. Feltárás után centrifugáltuk (20 000 g, 10 perc, 4°C) a sejt-lizátumszint a törmelékek eltávolítása céljából. Az MSC-kból származó lizátumszinteket négyszeres SDS-mintapufferrel 3 percig főztük.

A V5-Tks4^{wt} és V5-Tks4^{PRRN-TTMmut} konstrukciókkal transzfektált sejtek immunprecipitációját kereskedelmi forgalomban kapható V5-gyantával végeztük. A kísérletekhez 25 µl V5-agarózhoz, melyet előzőleg jéghideg PBS-sel ötször átmostunk, 1 ml sejtlyázatót mértünk és 1 órán keresztül 4°C-on forgattuk. Az inkubációs idő letelte után a gyöngyöket centrifugálással (20 000 g, 1 perc, 4 °C) üleptítettük, majd négyszer egymás után 1% Triton X-100-at tartalmazó, hűtött PBS-sel mostuk. Végül a leüleptített gyöngyökről eltávolítottuk a foszfát puffert és 35 µl kétszeres SDS-mintapufferrel 3 percig főztük.

A mintákat SDS tartalmú, megfelelő töménységű poliakrilamid-gélen választottuk el, amit azután PVDF membránra blottoltunk át egy éjszakán keresztül 25 V-n. Az előhívás az „Ellenanyagok” pontban ismertetett elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal történt, melyeket a gyártó által javasolt koncentrációkban alkalmaztunk. A membránt először 5% tejpor tartalmú foszfát pufferben blokkoltuk egy órát, majd az elsődleges ellenanyagban inkubáltuk ismét egy órát. Három rövid (5 perc) mosási lépést követően a másodlagos ellenanyagban 30 percet billegtettük, végezetül négyszer 15 percig mostuk a PVDF membránt. Az ellenanyagok beoldására és a mosásokhoz is 1% tejpor és 0.4% Tween20 tartalmú PBS-t használtunk. A detektálást ECL-reagenssel és fényérzékeny filmmel végeztük.

5.13 Immunfluoreszcens festés

A Tks4 állványfehérje expresszióját az MSC-kben immunfluoreszcens festéssel is vizsgáltuk. Ehhez a sejteket µ-Slide 8-well ibiTreat sejtenyésztő tárgylemezre ültettük ki, majd 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk őket 10 percig. Ezt követte az 0.1%-os Triton X-100-al való mosás és 2.5%-os FBS-sel történő blokkolás 30 percig. Az alkalmazott elsődleges ellenanyag ebben az esetben poliklonális anti-Tks4 volt, amelyet 1:1000 hígítási arányban használtunk 1 órán keresztül. Ezzel egy időben az aktin citoszkeleton megfestése TRITC-Phalloidinnal (P1951) történt 1:500 hígítással. A 0.05%-os Triton X-100-as mosásokat követően a mintákat AlexaFluor488-jelölt, anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk 30 percig egy órán keresztül. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. A fixált sejtekről készült képeket Zeiss LSM 710 típusú konfokális mikroszkóppal készítettük.

5.14 Proximitás ligációs vizsgálat

Az *in situ* interakció tanulmányozása Duolink In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit (DUO92101-1KT) felhasználásával történt. A proximitás ligációs vizsgálat (Duolink proximity ligation assay, DPLA) során speciális, oligonukleotidokkal kiegészített másodlagos antitestek

segítségével válik láthatóvá a célfehérjék közti interakció. Kísérleteinkben a DPLA anti-nyúl plusz és a DLPA anti-egér mínusz antitest az „Ellenanyagok” pontban leírt nyúl Src vagy Src-pY418, illetve egér V5 elsődleges ellenanyagokhoz képes kötődni.

A „COS7 sejtek fenntartása, transzfekciója és EGF stimulációja” pontban leírtak szerint növesztettünk sejteket, majd ezeket a megfelelő kezelések után hideg 4%-os paraformaldehid-PBS oldattal fixáltuk 15 percig, miközben a lemezt jégen tartottuk. A permeabilizálás 0.1%-os, PBS-ben oldott Triton-X 100-al történt 5 percig. A blokkolást és az azt követő lépéseket a Duolink Starter Kit-hez tartozó oldatokkal végeztük, a gyártó leírása szerint. Az elsődleges ellenanyagokat a V5 esetében 1:200, illetve az Src és Src-pY418 esetében 1:100 hígítási arányban alkalmaztuk 60 és 120 percig.

Amennyiben a másodlagos antitestek megfelelő közelségbe tudnak kerülni az interakció kialakulásának következtében, az oligonukleotid végek az összekötő-oligonukleotidok jelenlétében és a megfelelő ligáz hatására képesek konjugálni egymással egy zárt kört alkotva. Ezt a hozzáadott DNS-polimeráz általi gördülő gyűrűs (rolling circle) amplifikáció követi, melynek eredményeként az így kapott termékhez számos, fluoreszcens molekulával jelölt nukleotid szonda hibridizál. A detektálás során a megfelelő hullámhosszon gerjesztve és emissziós tartományban mérve a hibridizált szondák fluoreszcens pöttyöket alkotva jelennek meg, amelyek egy-egy interakciós eseményt jelölnek. A sejtmagokat DAPI festéssel tettük láthatóvá. Az értekezésben bemutatott képeket Zeiss LSM 710 típusú konfokális mikroszkóppal készítettük. A DPLA-hoz tartozó statisztika az ImageJ program FindFoci funkciójával készült, melyhez a sejtmagokhoz tartozó fluoreszcens pöttyök számát néztük, kísérletenként 200-200 sejtmagot leszámolva.

5.15 GST interakciós kísérletek

A kötődési vizsgálatokhoz első lépésként 25 µl, PBS-sel átmosott GSH-gyantához 1 ml GST fúziós fehérjét tartalmazó Rosetta (DE3) pLysS lizátumot adtunk és 30 percig szobahőmérsékleten forgatva inkubáltuk, így immobilizálva a különböző GST-Tks4 szakaszokat (csali fehérje). Ezt követően a gyöngyöket 4-szer PBS-sel, majd kináz pufferrel átmostuk. A kötött Tks4 fragmensek foszforilációját a „Foszforiláció” pontban ismertetett módon EphB1 kináz doménjével végeztük, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben a foszforiláció 1 órán keresztül tartott. A foszforilált mintákat szintén 4-szer mostuk foszfát pufferrel, hogy ne maradjon benne a kináz. Ezután a gyöngyökre ráértük a különböző Src doméneket (préda) úgy, hogy ezeknek a végső koncentrációja 100 µM legyen és ismét 30 percig

inkubáltuk. A felesleges vagy nem kötődő Src domének eltávolításához újabb mosási lépések következtek. A visszamaradó fehérjét SDS-mintapufferrel oldottuk le a GSH-gyantáról, majd megfelelő töménységű poliakrilamid-gélen választottuk el, amit Coomassie fehérje festékkel festettünk meg. Minden esetben kontrollként felvittünk a gélre az adott kísérlethez tartozó tisztított Src domén oldatából is.

5.16 Fluoreszcencia polarizációs kísérletek

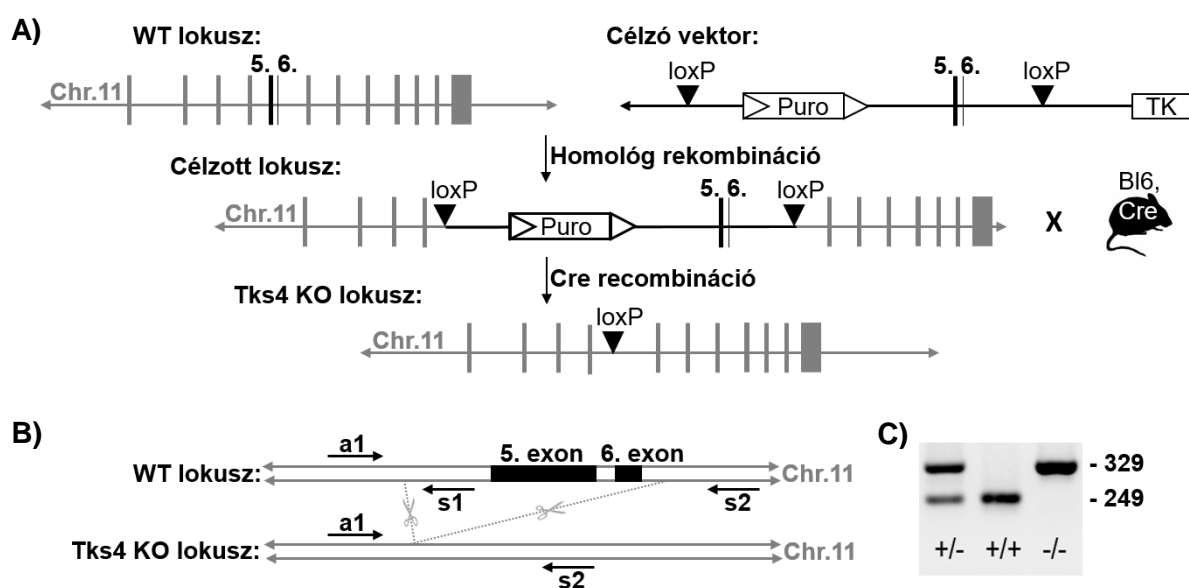
A mérés során az általunk termelt Src domének és Tks4 szakaszok közötti kötődést vizsgáltuk fluoreszcens peptidek segítségével. A jelölt peptidek síkban polarizált fénynyalábbal megvilágítva olyan fluoreszcens fényt bocsájtanak ki, aminek polarizációs foka attól függ, hogy mekkora a komplex képződés mértéke. A kisméretű fluoreszcensen jelzett peptid önmagában olyan gyorsan forog, hogy a fluoreszcens fény polarizáltsága szinte eltűnik. Viszont ha komplexet alkot egy nagyobb méretű fehérjével (jelen esetben ez az Src-SH3, -SH2 vagy -SH3-SH2), annyira lelassul a forgása, hogy a fény nagymértékben polarizált marad és a jel nő. A kísérletekhez a GenSript vállalattól két fluoreszcein (Fl) jelölt peptidet rendeltünk: Fl-SLARRPLPLP-NH₂ [173] és Fl-G(pY)EEIA-NH₂ [174]. Az előbbi az Src SH3, az utóbbi az SH2 doménjére specifikus.

A riporter peptid fluoreszcencia polarizációs (FP) változását növekvő kináz koncentráció jelenlétében mértük le (direkt titrálás). A jelölt peptidekhez tartozó K_d -k ismeretében, a jelöletlen Tks4 fragmensek és az Src domének affinitását kompetitív titrálással mértük meg úgy, hogy a kináz SH3 vagy SH2 doménje a jelölt molekulával ~80% kezdeti telítettségben legyen. A minták összeállításához egy ún. titráló puffert (20 mM TRIS pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% Brij35P, 2 mM DTT) használtunk. Minden mintából 3-szor 20 μ l-t pipettáztunk 384-lyukú plate-re és az FP jelet Cytation 3 Cell imaging Multi-Mode Reader műszeren 490nm-es gerjesztéssel és 520nm hullámhosszú emissziós tartományban mértük. A három párhuzamos mérésből kapott adatokat az OriginPro7 programmal értékeltük ki.

6 EREDMÉNYEK

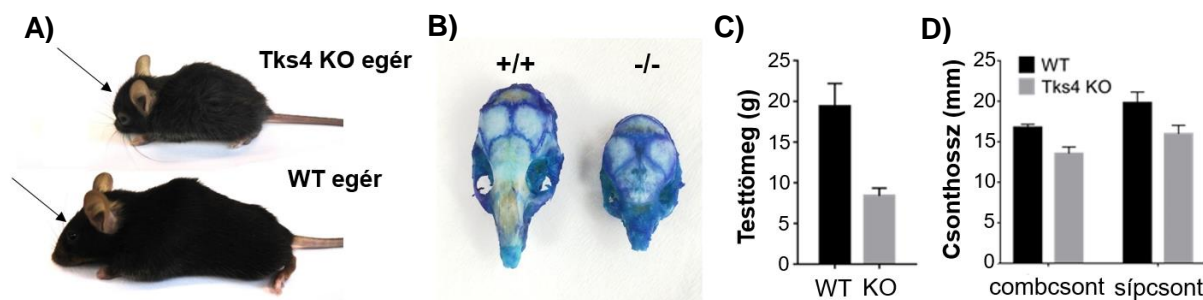
6.1 Az Tks4-hiányos egerek jellemzése

Laborunk egyik fő célja a Tks4 állványfehérje minél szélesebb körű tanulmányozása, amelynek első fontos lépése az Tks4-hiányos egerek előállítása volt. A korábban leírt módon, a kondicionális génkiütött és a Cre rekombinázt hordozó egerek keresztezésével sikeresen eltávolításra kerültek a Tks4-et kódoló *SH3PXD2B* gén loxP helyekkel határolt 5-ös és 6-os exonjai, így létrehozva a mutáns C57Bl/6 egereket (15. ábra). Bár a génkiütött egerek életképesek és megfelelő a fiú-lány arány, mégis terméketlenek.



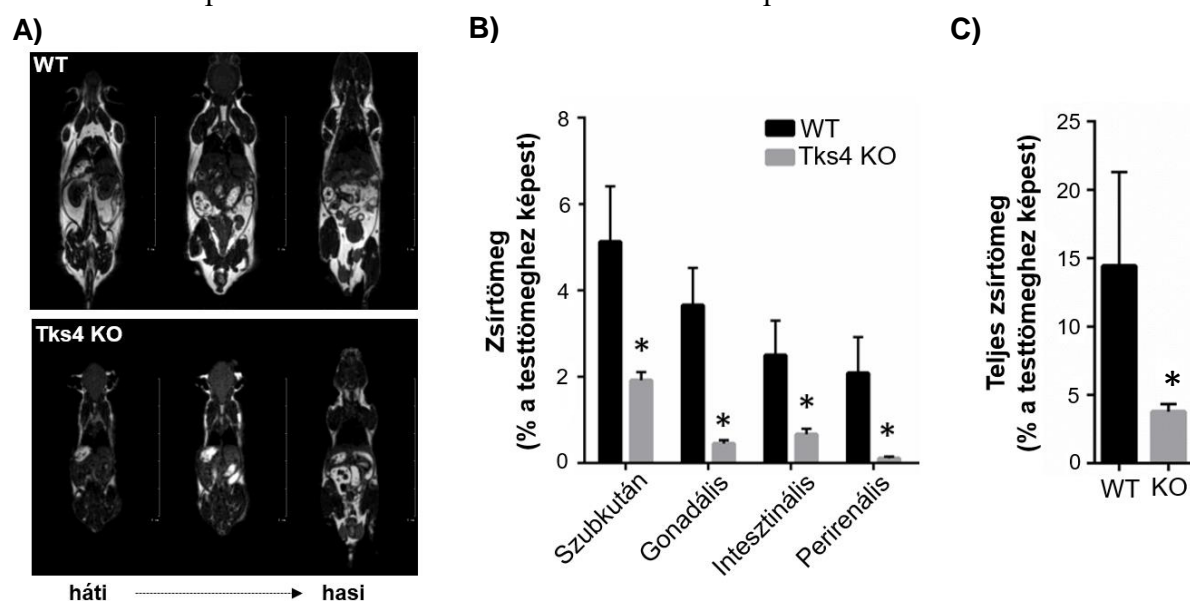
15. ábra – A Tks4-hiányos egér előállítása. A) A Tks4 5-ös és 6-os exonjának eltávolítására irányuló génmódosítási módszer. A célzó vektorban az 5-ös és 6-os exon loxP helyekkel határolt. A pozitív szelekcióhoz a 4-es exon után egy puromicin rezisztencia gén kazetta, a negatív szelekcióhoz a 6-os exont melletti loxP helyet követően a timidin kináz génje került beillesztésre. A mutáns allélt hordozó egerek a Cre rekombinázt hordozó transzgenikus egerekkel lettek keresztezve. B) Az 5-ös és 6-os exon eltávolításának ábrázolása a 11-es kromoszómán. Az ábrán a nyilak jelölik az *SH3PXD2B* génre alkalmazott primereket (a1, s1, s2) és az amplifikált régiókat (WT: 249 bp, KO: 329 bp). C) A heterozigóta (+/-), a vad típusú (+/+) és génkiütött (-/-) egerek PCR alapú genotipizálása. A heterozigóta egerek (+/-) utódaiból származó genomális DNS amplifikációja az eltávolított exonokhoz közeli primer szekvenciákat (a1, s1, s2) alkalmazva.

A Tks4 állványfehérje deléciójának következtében több fenotípusos eltérés is megfigyelhető, mint a vad típusúhoz képest kisebb testméret, koponyát érintő abnormalitások, kiemelkedő és erőteljes homlok, deformált szemek, hajlott és megrövidült csöves csontok, valamint háti kifőzsis (16. ábra).



16. ábra – A Tks4-hiányos egér jellemzése. A) A Tks4-hiányos egér (fent) és vad típusú alomtársa (lent). A nyilak a KO egér megrövidült orrcsontját mutatják a WT egérhez képest. B) A 8 hónapos vad típusú és génkiütött egerekből származó, metilénkéssel festett koponyatetők összehasonlítása. C) A 8-10 hónapos KO (n=4) és WT (n=3) egerek testsúlya. D) A 8-12 hónapos KO (n=5) és WT (n=5) egerek csontossza. A hibasávok a szórást jelölik.

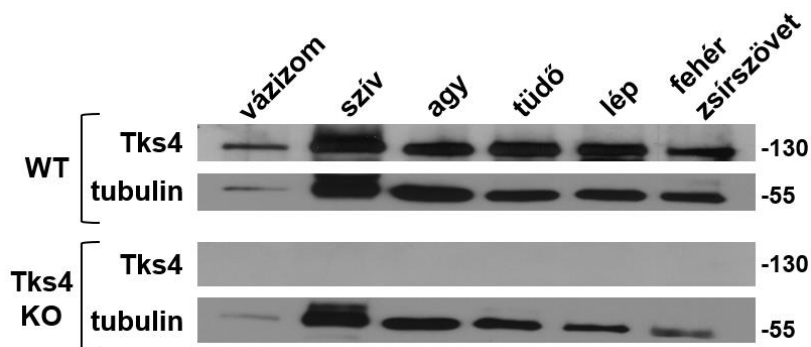
Készültek MRI felvételek, amelyek alapján nagymértékű zsírfogyatkozás állapítható meg a mutáns egereknél (17. ábra). Az alábbi megfigyelést tovább erősíti az egerek fizikai feltárása során tapasztalt jelentősen csökkent teljes zsírtömeg, továbbá a szubkután, gonadális, intesztinális és perirenális fehér zsírszövetek különálló zsírpárnái is kisebb méretűek.



17. ábra – Az MRI mérések eredményei. A) A 7 hónapos vad típusú (fent) és génkiütött (lent) hím egerekről készült MRI képeken a zsírszövet (fehér) és az egyéb szövetek (szürke vagy fekete) láthatóak. B) A különböző helyeken felhalmozódó zsírszövetek 7 hónapos WT (n=3) és KO (n=3) egerekből lettek izolálva. C) A teljes zsírtömeg meghatározása három WT és három KO felnőtt egérből történt. *p<0.05. A két csoport közti különbség szignifikanciájának meghatározása kétmintás t-próbával történt. A hibasávok a szórást jelölik.

Annak érdekében, hogy a Tks4 expresszióját tanulmányozzuk, illetve a mutáns egereknél a fehérje hiányát ellenőrizzük, különböző szöveteket vizsgáltunk Western blot módszerrel. Az elemzés során a vad típusú vázizomból, agyból, szívből, tüdőből, lépből és fehér zsírszövetből

származó mintákban sikeresen kimutattuk a Tks4 jelenlétét, míg az elvárásnak megfelelően a Tks4 teljes mértékben hiányzott a génkiütött szövetekből (18. ábra).

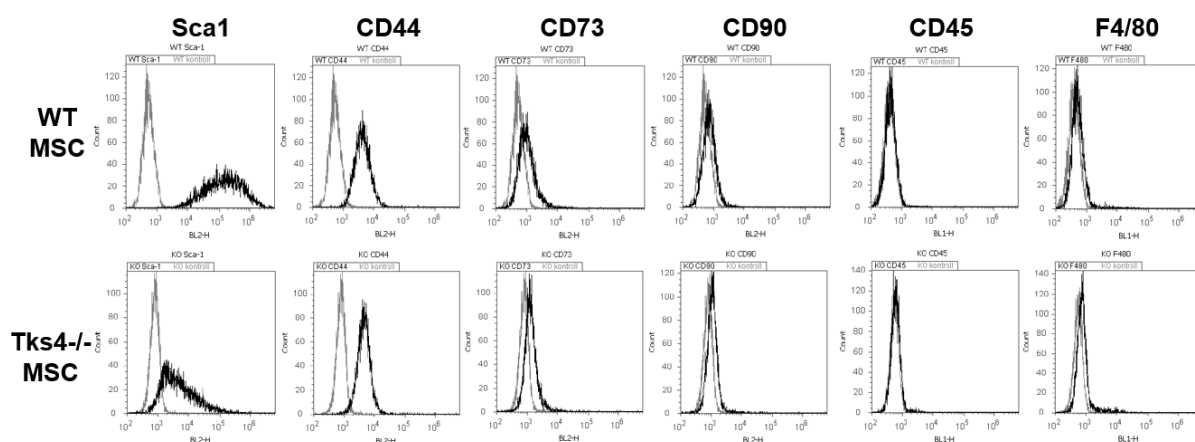


18. ábra – A Tks4 expressziója különböző szövetekben. A Tks4 expressziójának kimutatásához a vad típusú és génkiütött egerekből származó váizom, szív, agy, tüdő, fehér zsírszövet (gonadális fehér zsírszövet) és lép lizátumok elemzése Western blot technikával. A minták és a gélek kezelése és futtatása azonos kísérleti körülmények mellett történt. A tubulin kontrollként szolgál a minták ellenőrzéséhez.

6.2 A Tks4-hiányos egerekből származó csontvelői MSC-k karakterizálása

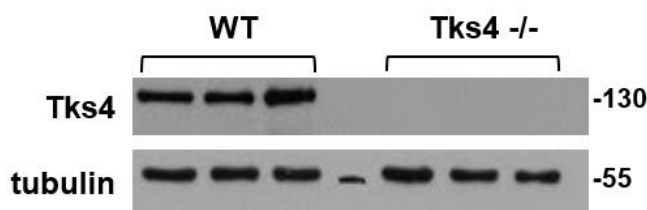
Az egerekről tett megfigyeléseink alapján a betegség által főként érintett szövetek a csont-, porc- és zsírszövet, melyek mind mesenchymalis eredetűek. A mesenchymalis stroma sejtek képesek differenciálódni a megfelelő szövetek irányába, viszont ezekben a differenciációs folyamatokban a Tks4 szerepe és jelenléte nem volt ismert. Megvizsgáltuk ezért a Tks4 expresszióját a csontvelői MSC-kben, illetve vizsgáltuk, hogy mennyire szükséges a fehérje jelenléte a differenciációs folyamatokhoz. Az MSC-k izolálása a vad típusú és génkiütött egerekből az irodalomban leírt protokolloknak megfelelően történt [175][176]. Ahhoz, hogy a tenyésztett kultúrákat MSC-knek nevezhessük, a sejteknek különböző kritériumoknak kell megfelelniük. Tekintve, hogy jelenleg nincsen egy, az MSC-kre specifikus marker vagy jól definiálható markerkombináció, amely egyértelműen elkülönítené ezeket a sejteket a belőlük származó, de már szűkebb differenciációs potenciállal rendelkező sejtektől, ezért született a mesenchymalis őssejtekre egy minimum kritériumokat magába foglaló ajánlás, amely szerint karakterizáltuk a sejteket [124]. A fibroblaszt szerű sejteket áramlási citometriával vizsgáltuk. Az így kapott immunfenotipizálás kimutatta, hogy az egerekből származó kultúrák negatívak a mieloid és limfoid vonalakra jellemző sejtfelszíni antigénekre, mint a CD45, F4/80, emellett pozitívak az MSC-ket leíró markerekre, mint az Sca-1, CD44, CD73(19. ábra). Az általunk vizsgált sejtek CD90-re negatívak voltak, amely szintén az MSC-k definiálására szolgáló marker, ám ennek megjelenése szövetfüggő és a csontvelői eredetű eger MSC-ken nem fordul elő [177]. Az elvárásoknak megfelelően a sejtfelszíni antigének

expressziója megegyezik a vad típusú és a mutáns egerek esetében, valamint összevethető más egerekből származó mesenchymalis sejtvonalakkal [178][179].



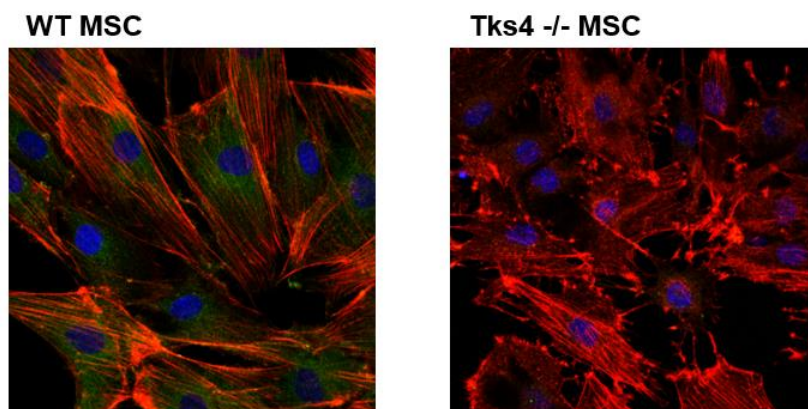
19. ábra – A csontvelői MSC-k karakterizálása az expresszált sejtfelszíni markerek alapján. A hatodik passzázsából származó vad típusú és génkiütött csontvelői mesenchymalis őssejtek sejtfelszíni markereinek elemzése áramlási citometriával.

Korábban még nem vizsgálták, hogy a csontvelői MSC-kben kifejeződik-e a Tks4 fehérje, így ezt az összes izolált sejtvonalon ellenőriztük. Ahogy a Western blot kísérletek mutatják, a vad típusú MSC-k expresszálják a Tks4-et, míg a génkiütött MSC-kből teljes mértékben hiányzik (20. ábra).



20. ábra – A Tks4 expressziója a csontvelői MSC-kben. Három független vad típusú és Tks4-hiányos CSV-MSC sejtvonalból származó sejt kivonatok Western blot analízise. A fehérje minták, SDS-PAGE módszerrel történő futtatását követően, anti-Tks4 ellenanyaggal lettek előhívva. A minták és a gélek kezelése és futtatása azonos kísérleti körülmények mellett történt. A tubulin kontrollként szolgál a minták egyenlő mennyiségének ellenőrzéséhez.

A Tks4 sejten belüli megjelenítéséhez a speciális tárgylemezre kiültetett sejteket az immunfluoreszcens festést követően mikroszkóppal vizsgáltuk. Az elkészült képek alapján a fehérje citoplazmatikus expressziós mintázatot mutat a vad típusú MSC-kben, míg a mutáns sejtekből hiányzik (21. ábra). Érdeemes megjegyezni, hogy a vad típusú sejtek nagy részénél stressz aktin szálak vehetőek észre, ellenben a mutáns sejtekkel, ahol az F-aktin inkább a sejt periferiája körül jelenik meg. Ezek a megfigyelések összhangban vannak azzal, hogy a Tks4 képes az aktin regulátorok toborzására és megkötésére, így az aktin filamentumok elrendeződése eltérhet a fehérje jelenlététől függően [1].



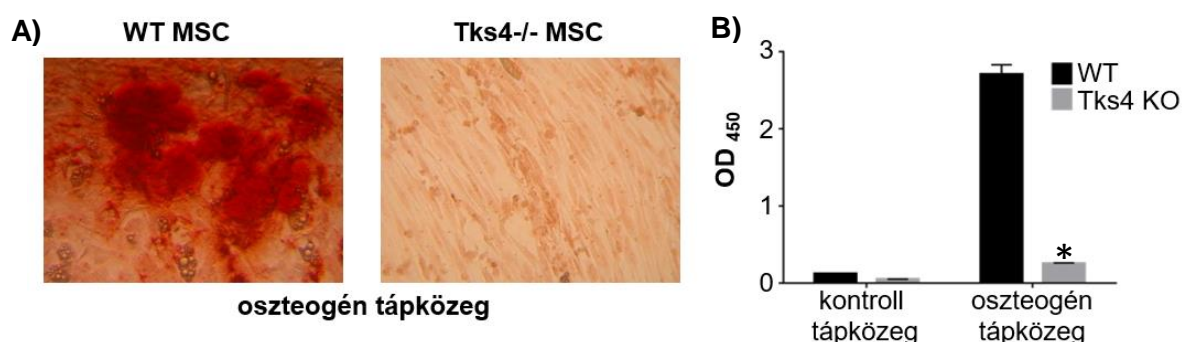
21. ábra – A csontvelői MSC-k vizsgálata konfokális mikroszkóppal. A vad típusú és Tks4-hiányos sejt kultúrákról készült reprezentatív fluoreszcens felvételek. A speciális tárgylemezre kiültetett sejtek fixálását és permeabilizálását követően, a sejtmagok festése DAPI-val (kék), az aktin filamentumok jelölése Phalloidin-TRITC (piros) festékekkel, valamint a Tks4 kimutatása Alexa Fluor 488 (zöld) felhasználásával történt.

6.3 A Tks4 hatása a csontvelői MSC-k csont és zsír irányú differenciációjára

Miután a sejtfelszíni markerekkel sikerült karakterizálni az izolált csontvelői MSC sejteket, teszteltük az MSC-k multipotens képességét, amelyhez először oszteogén differenciációs körülményeket alkalmaztunk. A vad típusú és mutáns kultúrák közötti különbségeket Alizarin Red S festéssel és Western blot módszerrel vizsgáltuk.

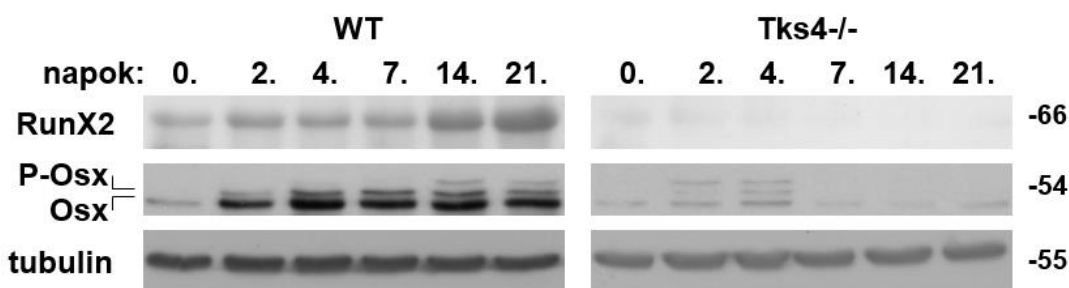
A festett MSC-kről készült képeken jól látszik, hogy a Tks4-hiányos sejtek alig voltak képesek kalcium-tartalmú ásványokat felhalmozni és a fenotípusuk sem változott, miközben a vad típusú sejtek gyorsan hidroxipapatitot kiválasztó oszteoblaszt sejtekké alakultak át (22. ábra). A megkötött festék visszaoldásával nyert minták fotometrikus elemzése szintén megerősítette, hogy a Tks4-hiányos MSC-k jóval kisebb mértékben tudtak csont irányba differenciálódni (22. ábra).

A differenciációs zavar további jellemzéséhez két fő oszteogén transzkripciós faktor, a RunX2 és az Osterix, expressziós szintjét vizsgáltuk Western blot technika segítségével [180]. A várakozásoknak megfelelően, a vad típusú MSC-kben a Runx2 szintje láthatóan megemelkedett [181][182], ezzel szemben a Tks4 hiányos sejtekben nagyon alacsony volt, sőt még csökkent is a csont irányú differenciáció során (23. ábra).



22. ábra – A Tks4-hiányos csontvelői MSC-k megváltozott csont irányú differenciációs képessége. A) A vad típusú és Tks4-hiányos MSC sejtek inkubálása oszteogén differenciációs médiumban, majd a kalcium-tartalmú ásványok felhalmozódásának nyomonkövetése Alizarin Red S festéssel. A kultúrákról készült reprezentatív képek a tenyésztés 14-ik napján 10x-es nagyítással készültek. B) A felhalmozódott kalcium mennyiségi meghatározása a kioldott Alizarin Red S festék abszorbanciájának mérésével (n=3). *p<0.05. A két csoport közti különbség szignifikanciájának meghatározása kétmintás t-próbával történt. A hibasávok a szórást jelölik.

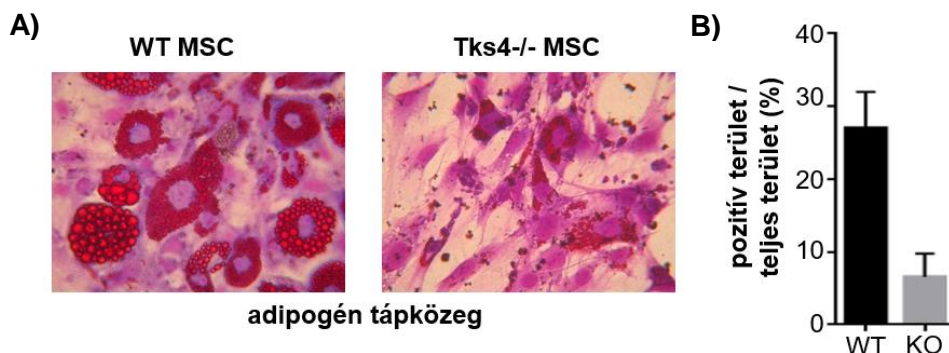
A másik transzkripciós faktor, az Osterix szintén jelen van a vad típusú sejtekben a differenciáció alatt, továbbá a fehérje foszforilációja is megfigyelhető, mivel a kísérlet során a foszforilált Osterix (P-Osx) alacsonyabb mobilitást mutat, mint a nem foszforilált forma [183]. Ellenben a mutáns sejtekkel, ahol az Osterix csak kis mértékben fejeződik ki és alig foszforilálódik, mindez arra utal, hogy a fehérje transzaktivációs aktivitása alul szabályozott (23. ábra). Az itt felsorolt eredmények alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a Tks4 állványfehérje hiányában sérül az oszteogén differenciációs folyamat.



23. ábra – A RunX2 és Osterix expressziós szintje a csontvelői MSC kultúrákban. Az *in vitro* csont irányú differenciáció alatt a RunX2 és az Osterix oszteogén markerek expressziós szintje a vad típusú és Tks4-hiányos MSC-kben. A sejtizátumok különböző időpontokban lettek felvéve és ezek elemzése Western blot technikával történt. A minták és a gélek kezelésének és futtatásának kísérleti körülményei azonosak voltak. A tubulin kontrollként szolgál a minták egyenlő mennyiségének ellenőrzéséhez.

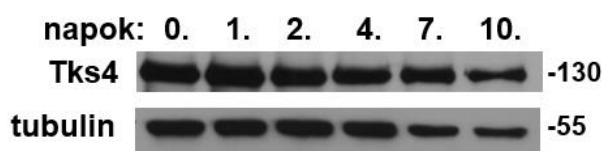
A következőkben a csontvelői kultúrák adipogén potenciálját tanulmányoztuk, így az MSC-ket napokon keresztül adipogén differenciáltató médiummal kezeltük. Egy héttel a differenciáltatás megkezdése után a termelt zsírcseppeket Oil red O festéssel mutattuk ki. A vizsgálat során csak a vad típusú sejtekben volt észlelhető a zsírcseppek kialakulása, a mutáns sejteknél csupán elvétve lehetett cseppeket találni (24. ábra). A készült képek összehasonlítása

azt mutatja, hogy a Tks4-hiányos MSC-k nem voltak képesek hatékonyan zsír irányba differenciálódni.



24. ábra – A Tks4-hiányos csontvelői MSC-k csökkent zsír irányú differenciációs potenciálja. A) A vad típusú és Tks4-hiányos sejtek inkubálása adipogén differenciációs médiumban, majd a lipid cseppek keletkezésének nyomonkövetése Oil red O festéssel. A kultúrákról készült reprezentatív képek a tenyésztés 7-ik napján 10x-es nagyítással készültek. B) A felhalmozódott lipid cseppek mennyiségi meghatározása a sejtek Oil red O festék tartalma alapján történt (n=3). A hibasávok a szórást jelölik.

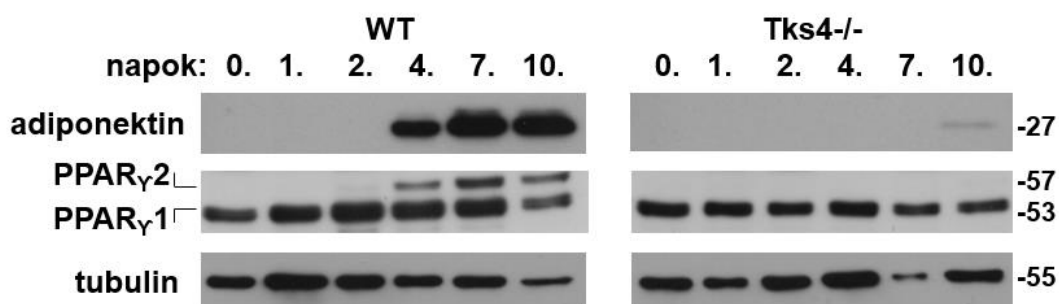
A további kísérletekben mélyrehatóbban vizsgáltuk az MSC-k differenciációja és a Tks4 közötti funkcionális kapcsolatot. Először ezért a vad típusú sejtekben vizsgáltuk a Tks4 jelenlétét a zsír irányú differenciáció alatt úgy, hogy az adipogén indukciót követő tíz nap során többször mintát vettünk és ezekből a mintákból mutattuk ki a Tks4-et. A 25. ábra egyértelműen mutatja, hogy a Tks4 fehérje folyamatosan expresszálódik, amely összhangban van egy korábbi tanulmánnyal, ahol 3T3-L1 sejtekben mRNS szintet vizsgáltak, illetve mutatták ki a fehérjét az adipogén differenciáció korai szakaszában [17].



25. ábra – A Tks4 expressziója a vad típusú csontvelői MSC-kben a zsír irányú differenciáció során. A megadott időpontokban felvett sejtizátumok elemzése Western blot technikával és anti-Tks4 ellenanyag alkalmazásával történt. A minták és a gélek kezelésének és futtatásának kísérleti körülményei azonosak voltak. A tubulin kontrollként szolgál a minták egyenlő mennyiségének ellenőrzéséhez.

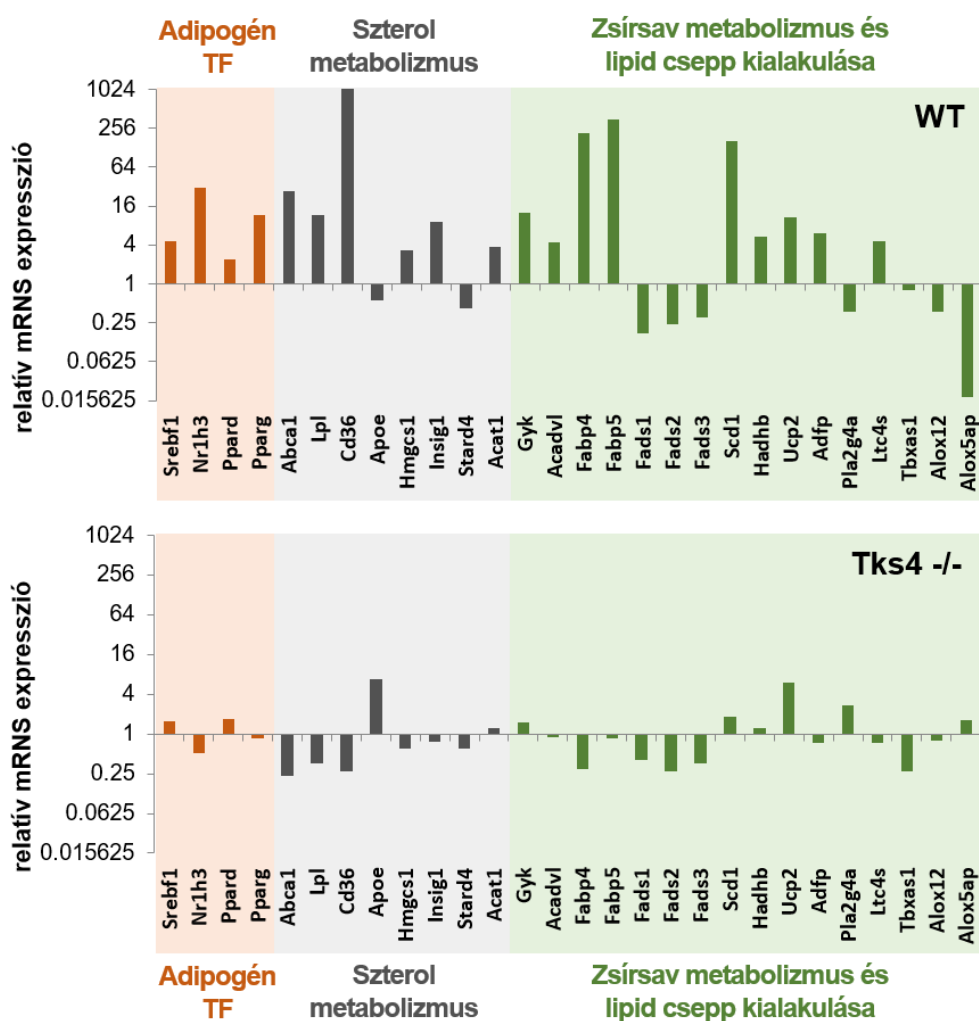
Irodalmi adatok alapján ismert, hogy számos szabályozó és szerkezeti fehérje szükséges a megfelelő zsírszöveti differenciációhoz, amelyek közül a következő kísérletben a PPAR γ és az adiponektin expresszióját tanulmányoztuk [184][185]. A PPAR γ -nak két izoformája ismeretes, a PPAR γ 1 és PPAR γ 2, melyek alternatív splicing mechanizmuson keresztül képződnek. A 2-es izoforma 30 aminosavval hosszabb, így kevésbé mozgékony az 1-es izoformához képest [186]. Az anti-PPAR γ antitesttel végzett immunoblot analízisből látható, hogy a vad típusú és génhiányos kultúrákban a PPAR γ 1 folyamatosan expresszálódik, míg a

PPAR γ 2 csak a vad típusnál jelenik meg a differenciáció negyedik napja körül (26. ábra). Az anti-adiponektin antitest felhasználásával az is kiderült, hogy az adiponektin a vad típusú MSC-kben viszonylag hamar, már a negyedik napon detektálható, miközben a Tks4 deficiens sejtekben nagyon alacsony szinten, a tizedik nap körül kezdődik meg az expressziója (26. ábra). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a Tks4 fehérje szükséges az adipociták kialakulásához, valamint a fehérje hiánya gátolja vagy késlelteti a zsír irányú differenciációt.



26. ábra – A PPAR γ és adiponektin expressziós szintje a csontvelői MSC kultúrákban. Az *in vitro* zsír irányú differenciáció alatt a PPAR γ és az adiponektin adipogén markerek expressziós szintje a vad típusú és Tks4-hiányos MSC-kben. A megadott időpontokban felvett sejtizátumok elemzése Western blot technikával történt. A minták és a gélek kezelésének és futtatásának kísérleti körülményei azonosak voltak. A tubulin kontrollként szolgál a minták egyenlő mennyiségének ellenőrzéséhez.

Az adipogenezisben a Tks4 jelentőségének további bizonyításához meghatároztuk több lipid-regulációs gén expressziós mintázatát. Az MSC-ket 4 napig inkubáltuk adipogén körülmények között, majd a mintákat az egerekre specifikus TaqMan Array vizsgálatnak vetettük alá (1. melléklet) [187][188]. Az elemzés kimutatta, hogy a vad típusú kultúrákban az adipocita differenciációt befolyásoló transzkripciós faktorok (például Srebf1, Nr1h3, PPAR γ) mRNS szintje megnőtt, de nem változott szignifikánsan a génkiűtött tenyészetek esetében. Továbbá a legtöbb szterol-metabolizmusban szerepet játszó enzim (mint az Abca1, Lpl, Cd36) expressziója csökkent mértékű volt a mutáns sejtekben. Ezen kívül a zsírsav szintézisre jellemző gének (például Fabp4, Fabp5, Scd1) kifejeződése jelentősen megnőtt a vad típusú mintákban, viszont szinte változatlan maradt a Tks4-hiányos MSC-kben (27. ábra). A mérési eredményeket összegezve, 19 lipid-szabályozó gén kifejeződése erősebb a vad típusú adipogén MSC kultúrákban, de a mutáns sejtekben gyakorlatilag megmarad a kiindulási expressziós szint. Mindez azt mutatja, hogy az adipogén körülmény a vad típusú MSC-k esetében több, a lipid anyagcsere szempontjából fontos gén expressziós profiljára induktív hatással volt, míg erre a Tks4-hiányos tenyészetek leginkább érzéketlenek voltak.



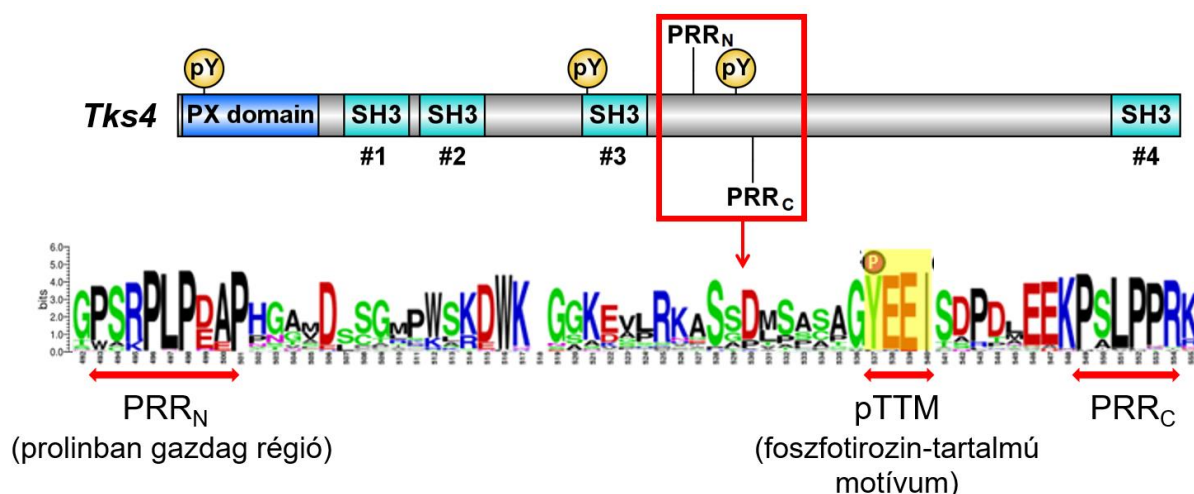
27. ábra – A lipid-regulációs gének expressziós szintjének vizsgálata a zsír irányba differenciáltított csontvelői MSC-ben. A zsír irányú differenciáció 4-ik napján a vad típusú és Tks4-hiányos MSC-kben a lipid-regulációs gének expressziós profil változásának vizsgálata TaqMan Array felhasználásával történt. Az mRNS szintek a differenciáció 0-ik napján (kontroll) mért értékekhez lettek viszonyítva (a tengelyen az 1-es), az n-szeres különbséget számolva. Az ábra a gének relatív expressziós szintjét mutatja. Az itt bemutatott gének expressziójában legalább kétszeres különbség figyelhető meg.

6.4 A Tks4 szekvencia analízise és a potenciális Src-kötő motívumok

A Tks4 állványfehérje esszenciális szereplője a mesenchymalis stroma sejtek differenciációjának, de nem csak ebben a folyamatban nélkülözhetetlen a jelenléte. Laborunk korábban kimutatta, hogy a Tks4 fontos résztvevője az EGF jelátviteli útvonalnak és a szignalizációt követően, eddig nem ismert módon, interakcióba lép az Src tirozin kinázzal. Ahhoz, hogy megfejtsük a kölcsönhatás kialakulásáért mely régiók lehetnek felelősek, először különböző adatbázisok segítségével elemeztük a Tks4 szekvenciáját.

A HOGENOM [170] adatbázisban elérhető összes Tks4 szekvencia összehasonlítása során több konzervált lineáris motívumot fedeztünk fel a fehérje rendezetlen részein (a teljes

összehasonlítás eredményét a 2. melléklet mutatja). Az ELM predikciós szerver segítségével térképeztük fel az Src SH3, illetve SH2 doménjeinek potenciális kötőhelyeit. Az Src-család tagjainál (például Fyn, Lck és Src) jól dokumentált, hogy az SH2 doménjük a kötődés szempontjából előnyben részesíti a partner szekvenciában található pYEEI motívumot [155]. Az ELM szerver összesen csak egy Src-SH2 kötő motívumot jósolt a Tks4-en belül (TTM, aminosavak: 508-511, YEEI), továbbá az ebben található 508-as tirozin az egyetlen ismert foszforilációs hely a Tks4 rendezetlen régiójában a PhosphoSitePlus adatbázis [19] és az irodalom [1][189] szerint. Ezek alapján feltételeztük, hogy a Tks4-ben ez az SH2 kötő motívum lehet felelős az Src-vel való szabályozott interakció kialakulásáért (28. ábra) [4].



28. ábra – A Tks4 fehérje szekvencia analízise és a potenciális Src kötő motívumok. A humán Tks4 domén szerkezetének és az Src-foszforilációs helyeinek sematikus ábrázolása. A PX domént, az SH3 doméneket és a rendezetlen linker régiókat a kék, a világoskék és a szürke színek mutatják. Az ismert tirozin foszforilációs helyek az Y25, az Y373 és az Y508 a PX doménben, a harmadik SH3 doménben, illetve a harmadik és negyedik SH3 domént összekötő linker régióban találhatóak. A homológ Tks4 szekvenciák illesztésének Weblogo ábrázolásán három konzervált lineáris motívum figyelhető meg (piros dupla nyilakkal kiemelve) a harmadik és negyedik SH3 doméneket összekötő hosszú rendezetlen régióban. A tirozinon foszforilált pYEEI motívumon (pTTM, foszfortirozin-tartalmú motívum, aminosavak: 508-511) kívül a Tks4 nem tartalmaz potenciális SH2-kötő motívumokat. A kiemelt konzervált motívum, a PRR_N (aminosavak: 466-474), rendkívül hasonlít az Src SH3 doménjéhez kötődő szekvenciákhoz. A pTTM motívumtól C-terminális irányba van egy másik potenciális SH3-kötő prolinban gazdag motívum is (PRR_C). A szekvencia-ábra a HOGENOM adatbázisból letöltött teljes hosszúságú Tks4 szekvenciák illesztése alapján készült. A Tks4 rendezetlen régiójában található potenciális kötő motívumok jóslása az ELM és PhosphoSitePlus felhasználásával történt.

Az Src kinázok szubsztrátjainál gyakran előfordul, hogy az SH2 mellett az SH3 doménnel is kölcsönhatásba lépnek [190][191], így a Tks4 szekvenciáját tovább elemeztük a lehetséges SH3 kötő motívumok megtalálása érdekében. A Tks4 rendezetlen szakaszát vizsgálva találtunk egy potenciális kötő motívumot (PRR_N, szekvencia: 466-474, PSRPLPDAP), amely nagyon hasonló egy már ismert Src-SH3 ligandumhoz (RPLPPLP, K_d ≈ 3.7 μM) [173]. Ezen kívül ez a szekvencia rész az SH2 kötő motívumhoz viszonylag közel található (33 aminosav távolságra), így esélyt ad egy két kötőhelyes kölcsönhatás, illetve szinergikus kötődés kialakulására. Az irodalmi adatok alapján a talált két potenciális Src kötő hely közötti távolság konzisztens más, az Src-vel tandem interakcióba lépő partnerekben megtalálható összekötő szakaszok hosszúságával. Ilyen partnerek például a cortactin [192][193], az AFAP-110 [194], a p130Cas [195], a FAK [196], a Sam68 [197] és az EFS [198] is (29. ábra). Az eddigi elemzésekből kiindulva feltételeztük, hogy az előbbiekben leírt, két prediktált motívum hozza létre a Tks4 és Src közötti interakciót.

Emellett azonosítottunk egy másik konzervált prolin gazdag régiót (PRR_C szekvencia: 520-525, PSLPPR) az SH2 kötő motívumtól C-terminális irányban (28. ábra), viszont ebben az esetben a két motívum közötti távolság jóval rövidebb (8 aminosav). A továbbiakban kísérletesen határoztuk meg, hogy a Tks4-ben jósolt SH2 és két SH3 kötő motívumok mennyire képesek kötődni az Src megfelelő doménjeihez.

		Hossz (AS)
KORTAKTIN (Q14247)	<u>QTPPVSPAPQPT</u> EERLPSSPVYEDA	14
AFAP-110 (Q8N556)	<u>MPLPEIPQ</u> PWLPPDSGPPPLPTSSLPEGYEEA	22
P130CAS (P56945)	<u>RPLPSPPKFTS</u> QDSPDGGYENSEGGWMEDYDYV	22
FAK (Q05397)	<u>RALPSIPKLANSEKQ</u> GMRTHAVSVSETDDYAEI	22
TKS4 (A1X283)	<u>RPLPDAPHGVMD</u> SGLPWSKDWKSKDVLKASSDMSASAGYEEI	33
SAM68 (Q07666)	<u>IPLPPPPAPET</u> YEEYGYDDTYAEQSYEGYEGYYSQSQGDSEYYDYG	34
EFS (O43281)	<u>YDVPLLGPEAPP</u> SPEPPGALASHDQDTLAQLLARSPPPPHRLPSAESLSRRPLPALP	48

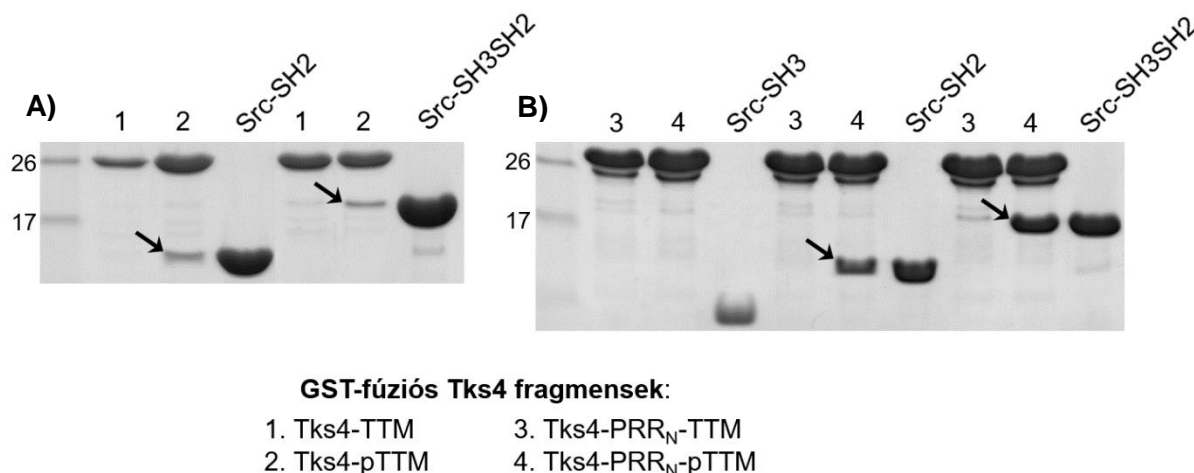
29. ábra – Az Src kötő motívumokat összekötő szakaszok hosszúsága. Az irodalomból gyűjtött fehérjék, amelyek kölcsönhatásba lépnek az Src SH3 és SH2 doménjével, szemléltetik a kötő motívumok közötti összekötő régiók optimális hosszúságát.

6.5 A Tks4 és az Src közötti kapcsolat szerkezeti háttere

Annak bizonyítására, hogy a Tks4 rendezetlen régiójában prediktált PRR_N és TTM képesek kötődni az Src SH3 és SH2 doménjeihez, különböző Tks4 és Src konstrukciókat teszteltünk GST interakciós vizsgálattal. A Tks4 fragmenseket (Tks4-TTM, aminosavak: 505-516; Tks4-PRR_N-TTM, aminosavak: 466-516) GST-fúziós fehérjeként *E. coli*-ban expresszáltuk, GSH-agaróz gyöngyökön immobilizáltuk, majd a kísérletekhez szükséges foszforilált verziókat (Tks4-pTTM, Tks4-PRR_N-pTTM) *in vitro* foszforilációval hoztuk létre (lásd Anyagok és Módszerek). Ezt követően a tisztított, rekombináns Src doménekkel (SH3,

SH2, SH3-SH2) inkubáltuk a megfelelően előkészített gyöngyöket, ahogy a „GST interakciós kísérletek” pontban szerepel.

A kötődési vizsgálatok azt mutatták, hogy a csaliként használt, foszforilált Tks4 fragmensek (GST-Tks4-pTTM és GST-Tks4-PRR_N-pTTM) képesek voltak precipitálni az Src-SH2 és az SH3-SH2 doméneket egyaránt (30. ábra), míg a nem foszforilált konstrukcióknál (GST-Tks4-TTM és GST-Tks4-PRR_N-TTM) nem volt detektálható kötődés (30. ábra). Az alkalmazott kísérleti körülmények mellett az Src-SH3 és a GST-Tks4-PRR_N-TTM vagy GST-Tks4-PRR_N-pTTM között nem tudtunk interakciót kimutatni. Ennek oka lehet, hogy az SH3 domén affinitása a Tks4 prolinban gazdag régiójához viszonylag alacsony (lásd később), így a mosási lépések alatt nagymértékű disszociáció léphet fel, amely miatt ez a módszer alkalmatlanná válhat a kölcsönhatás vizsgálatára.

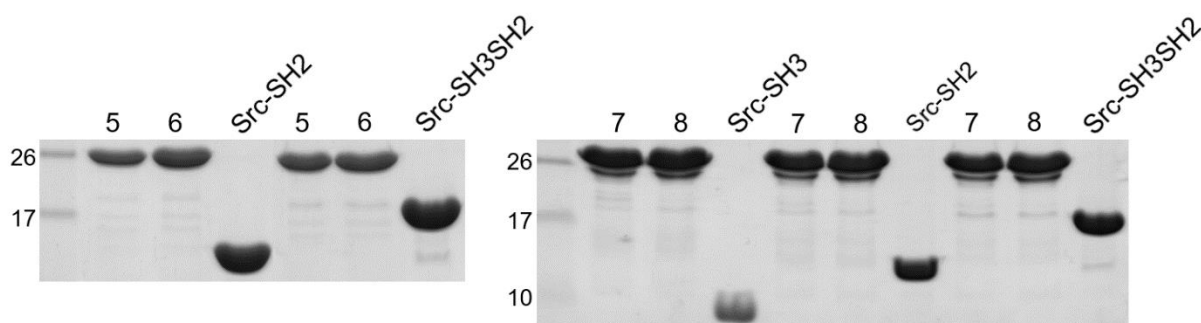


30. ábra – A különböző Src és GST-fúziós Tks4 fragmensek asszociációja *in vitro*. A) Az Src SH2 és SH3-SH2 domének precipitálása a GST-Tks4-TTM (1) és az ennek megfelelő foszforilált GST-Tks4-pTTM (2) fragmensekkel. B) Az Src SH3, SH2 és SH3-SH2 domének precipitálása a GST-Tks4-PRR_N-TTM (3) és az ennek megfelelő foszforilált GST-Tks4-PRR_N-pTTM (4) fragmensekkel. A 2-es és 4-es Tks4 fragmensek esetében a nyilak a sikeresen precipitált Src SH2 és SH3-SH2 domének pozícióját jelölik. Az Src-ből készült SH3, SH2 és SH3-SH2 konstrukciók kontrollként szerepelnek. A gélek egyszerre, azonos kísérleti körülmények között futottak.

Érdemes megfigyelni, hogy a GST-Tks4-PRR_N-pTTM fehérje kötődése a tandem Src-SH3-SH2 doménhez határozottan erősebb, mint az önálló SH2 doménhez, amely alapján feltételezhető a szinergikus kötődés kialakulása (30. ábrán látható nyilak).

A mutáns Tks4 konstrukciók, amelyekben az 508-as tirozint fenil-alaninra cseréltük, nem tudták megkötni a különböző Src fragmenseket (31. ábra), alátámasztva azt, hogy a két fehérje közötti stabil interakciót az 508-as tirozin foszforilációja szabályozza és, hogy a Tks4-ben található pTTM az Src-SH2-vel együtt kulcsfontosságú szerkezeti egysége a teljes kötési affinitás kialakulásának.

Az interakció vizsgálatához tartozó elemzések és eddig elvégzett kísérletek alapján igen valószínűnek tartottuk, hogy a Tks4-ben található két Src kötő szekvencia lehetővé teszi a kölcsönhatás szinergikus erősödését. A kötődés kvantitatív jellemzéséhez fluoreszcencia polarizációs (FP) esszét alkalmaztunk, amely során az Fl-SLARRPLPPLP-NH₂ [173] Src-SH3-ra és az Fl-G(pY)EEIA-NH₂ [174] Src-SH2-re specifikus, fluoreszcein jelölt peptideket használtuk fel a jelöletlen Tks4 konstrukciók (Tks4-PRR_N-TTM és Tks4-PRR_N-pTTM) kompetitív kötődésének méréséhez.

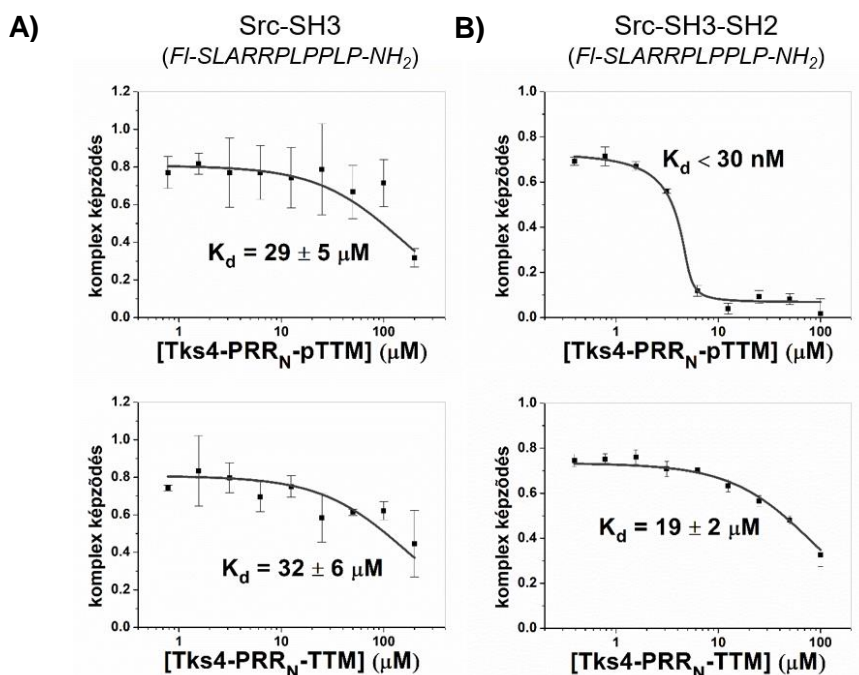


GST-fúziós Tks4 fragmensek:

- | | |
|--|--|
| 5. Tks4-TTM ^{Y508F} | 7. Tks4-PRR _N -TTM ^{Y508F} |
| 6. Tks4-TTM ^{Y508F} kinázzal kezelt | 8. Tks4-PRR _N -TTM ^{Y508F} kinázzal kezelt |

31. ábra – A különböző Src és mutáns GST-fúziós Tks4 fragmensek asszociációja *in vitro*. Az Y508F mutáns Tks4 fragmensek, azaz a GST-Tks4-TTM^{Y508F} (5), a kinázzal kezelt GST-Tks4-TTM^{Y508F} (6), valamint a GST-Tks4-PRR_N-TTM^{Y508F} (7), a kinázzal kezelt GST-Tks4-PRR_N-TTM^{Y508F} (8) szolgáltak negatív kontrollként a GST-fúziós konstrukciók foszforilációjához. Az Src-ből készült SH3, SH2 és SH3-SH2 konstrukciók kontrollként szerepelnek. A gélek egyszerre, azonos kísérleti körülmények között futottak.

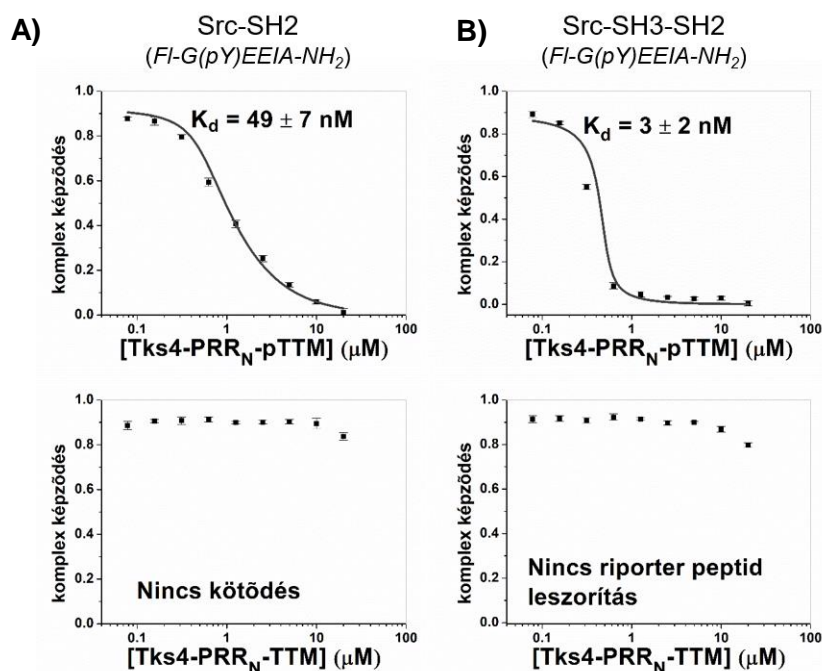
Az Src-SH3-hoz tartozó riporter peptid segítségével sikerült kimutatni a Tks4-PRR_N és Src-SH3 közötti gyenge kölcsönhatást ($K_d \approx 30 \mu M$), amely a Tks4 foszforilációs állapotától függetlenül jön létre (32. ábra). Továbbá a nem foszforilált Tks4 fragmens, a Tks4-PRR_N-TTM, és a tandem Src-SH3-SH2 domén esetében is nagyon hasonló volt a kötődési állandó, jelezve, hogy a Tks4-ben található két kötőmotívumot összekötő szakasz nem járul hozzá jelentősen az interakcióhoz. Azonban, ha az 508-as tirozint foszforiláltuk (Tks4-PRR_N-pTTM) három nagyságrenddel erősebb ($K_d < 30 nM$) kötődés volt megfigyelhető (32. ábra).



32. ábra – A különböző Tks4 fragmentek és az Src-SH3 és/vagy SH2 közötti kötési affinitások vizsgálata kompetitív titrálással. A különböző Src doménekkal, SH3 (A) és SH3-SH2 (B), és az FI-SLARRPLPPLP-NH₂ SH3 doménre specifikus fluoreszcein-jelölt riporter peptid segítségével elvégzett kompetitív FP mérések. A felső és alsó paneleken a jelöletlen Tks4-PRR_N-pTTM, illetve Tks4-PRR_N-TTM fragmentekhez tartozó kompetitív titrálások láthatóak. A hibasávok a három független kísérleten alapuló szórást jelölik.

Az Src-SH2-re specifikus riporter peptid felhasználásával igen erős kötődést mértünk a Tks4-PRR_N-pTTM és Src-SH2 között ($K_d \approx 50$ nM), amely még inkább fokozódott, ha az SH3 domén is jelen volt a vizsgálat során, azaz az Src-SH3-SH2 konstrukciót alkalmaztuk ($K_d \approx 3$ nM) (33. ábra). Azokban a kísérletekben, amelyeknél a Tks4 fragmentet nem foszforiláltuk (Tks4-PRR_N-TTM) egyik esetben sem volt detektálható az interakció, mivel a megfelelő SH2 ligandum hiánya megakadályozta a riporter peptid kompetitív leszorítását az Src SH2 doménjéről (33. ábra).

Az eddigi FP eredményeket összegezve, az Src-SH3 és Tks4-PRR_N interakciót leíró kötési állandó $30 \mu\text{M}$, valamint a Tks4-TTM szakasznak foszforiláltnak kell lennie az 508-as tirozinon ahhoz, hogy kölcsönhatásba lépjen az Src-SH2-vel, amelynek ~ 50 nM a kötési állandója. Bár két kísérletet is végeztünk a Tks4-PRR_N-pTTM konstrukciónak az Src-SH3-SH2-höz való affinitásának vizsgálatára (1. táblázat), a nanomoláris disszociációs konstansok meghatározására az a beállítás alkalmasabb, amelynél a riporter peptidhez tartozó K_d is ugyanebbe a tartományba esik (3. melléklet).



33. ábra – A különböző Tks4 fragmensek és az Src-SH3 és/vagy SH2 közötti kötési affinitások vizsgálata kompetitív titrálással. A különböző Src doménekkel, SH2 (A) és SH3-SH2 (B), és az FI-G(pY)EEIA-NH₂ SH2 doménre specifikus fluoreszcein-jelölt riporter peptid segítségével elvégzett kompetitív FP mérések. A felső és alsó paneleken a jelöletlen Tks4-PRR_N-pTTM, illetve Tks4-PRR_N-TTM fragmensekhez tartozó kompetitív titrálások láthatóak. A hibaszávok a három független kísérleten alapuló szórást jelölik.

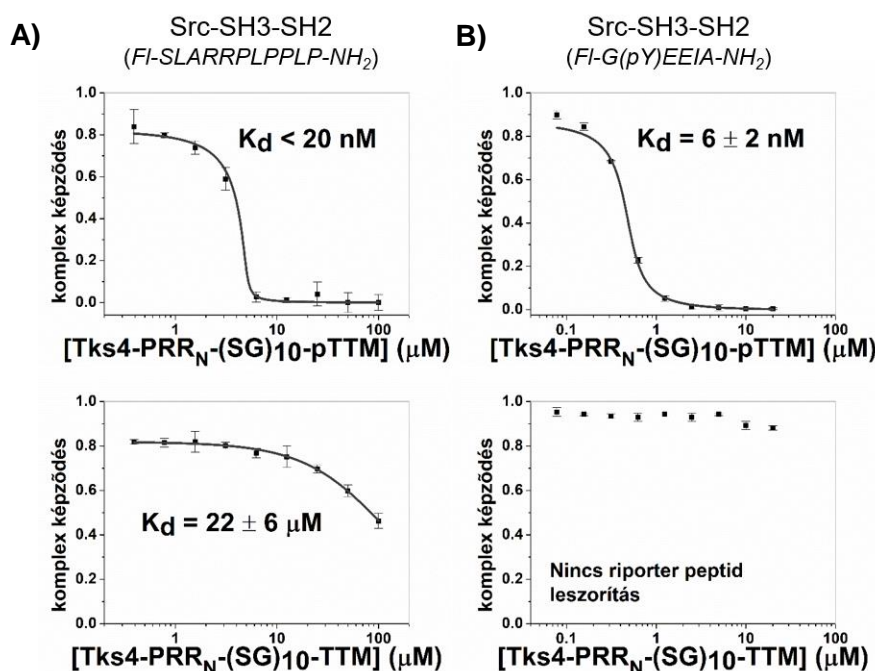
Ebből adódóan úgy véljük, hogy a Tks4-PRR_N-pTTM és Src-SH3-SH2 közötti disszociációs állandó helyes értéke a $\sim 3 \text{ nM}$. Az a tény, hogy az Src-SH3-SH2 és Tks4-PRR_N-pTTM esetén mért affinitás jóval erősebb kötődést mutat ($K_d \approx 3 \text{ nM}$) az önálló doménekhez és ligandumokhoz viszonyítva ($K_d \approx 30 \text{ μM}$ az SH3-nál és $K_d \approx 50 \text{ nM}$ az SH2-nél) egyértelműen jelzi a jelentős szinergiát, amely a Tks4-PRR_N és Src-SH3, valamint a Tks4-pTTM és Src-SH2 egyidejű interakciójakor jön létre.

Src domének	K_d	
	Tks4-PRR _N -TTM	Tks4-PRR _N -pTTM
SH3	$32 \pm 6 \text{ μM}$	$29 \pm 5 \text{ μM}$
SH2	Nincs kötődés	$(49 \pm 7) \times 10^{-3} \text{ μM}$
SH3-SH2	$19 \pm 2 \text{ μM}$	$(3 \pm 2) \times 10^{-3} \text{ μM}$

1. táblázat – Az FP mérések eredményei összegezve. A mért disszociációs konstansok és az illesztés alapján meghatározott hozzájuk tartozó standard hibák. A triplikátumok egymástól függetlenül elkészített, egy időben vizsgált minták voltak.

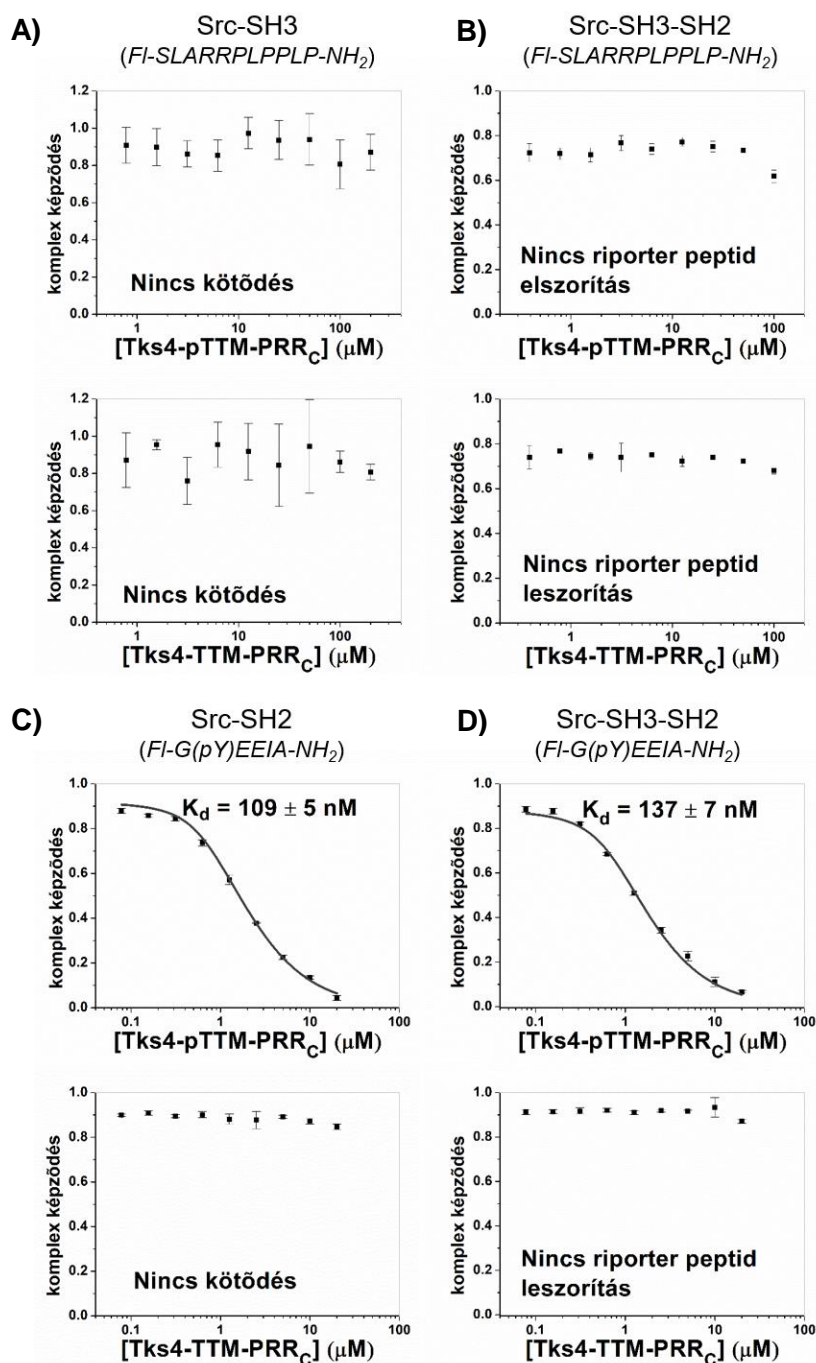
Fontos megjegyezni, hogy ezek az eredmények összhangban vannak a GST-precipitáció során kapott eredményekkel, amely arra utal, hogy a Tks4-PRR_N-pTTM régiója felelős az Src SH3 és SH2 doménjeivel való kölcsönhatásért és a két kötőhelyes kötődéssel kialakuló fokozott

affinitásért. Méréseink alapján a Tks4-ben található Src kötő motívumok megközelítőleg a megfelelő pozícióban helyezkednek el egymáshoz képest, amely azért lényeges, mert a nagy affinitású, tandem interakcióhoz elengedhetetlen a kötőhelyek közti optimális távolság [199]. Ezt bizonyítja, hogy a Tks4 linker régiójának 20 aminosavval való mesterséges meghosszabbítása (Tks4-PRR_N-(SG)₁₀-TTM és Tks4-PRR_N-(SG)₁₀-pTTM) a kötési affinitás csökkenését eredményezi (eredeti linker: $K_d = 3$ nM, hosszabb linker: $K_d = 6$ nM) (34. ábra).



34. ábra – A meghosszabbított Tks4 fragmensek és az Src-SH3-SH2 közötti kötési affinitások vizsgálata kompetitív titrálással. Az Src SH3-SH2 doménjével, és az FI-SLARRPLPPLP-NH₂ SH3 doménre specifikus, valamint az FI-G(pY)EEIA-NH₂ SH2 doménre specifikus fluoreszcein-jelölt riporter peptidek segítségével elvégzett kompetitív FP mérések. A felső és alsó paneleken a jelöletlen Tks4-PRR_N-pTTM, illetve Tks4-PRR_N-TTM fragmensekhez tartozó kompetitív titrálások láthatóak. A hibásávok a három független kísérleten alapuló szórást jelölik.

Továbbá a korábban leírt FP méréseket megismételve a Tks4-TTM motívumtól C-terminális irányba található potenciális Src-SH3 ligandummal, a Tks4-PRR_C-vel (520-525 aminosavak) azt láttuk, hogy ez a prolinban gazdag régió nem képes kötődni az Src SH3 doménjéhez (35. ábra).



35. ábra – A PRR_C motívumot tartalmazó Tks4 fragmensek és az Src-SH3 és/vagy SH2 közötti kötési affinitások vizsgálata kompetitív titrálással. Az Src SH3 (A), SH2 (C) és SH3-SH2 (B és D) doménjével, és az FI-SLARRPLPLP-NH₂ SH3 doménre specifikus (A és B), valamint az FI-G(pY)EEIA-NH₂ SH2 doménre specifikus (C és D) fluoreszcein-jelölt riporter peptidek segítségével elvégzett kompetitív FP mérések. A felső és alsó paneleken a jelöletlen Tks4-pTTM-PRR_C, illetve Tks4-TTM-PRR_C fragmensekhez tartozó kompetitív titrálások láthatóak. A hibaszávok a három független kísérleten alapuló szórást jelölik.

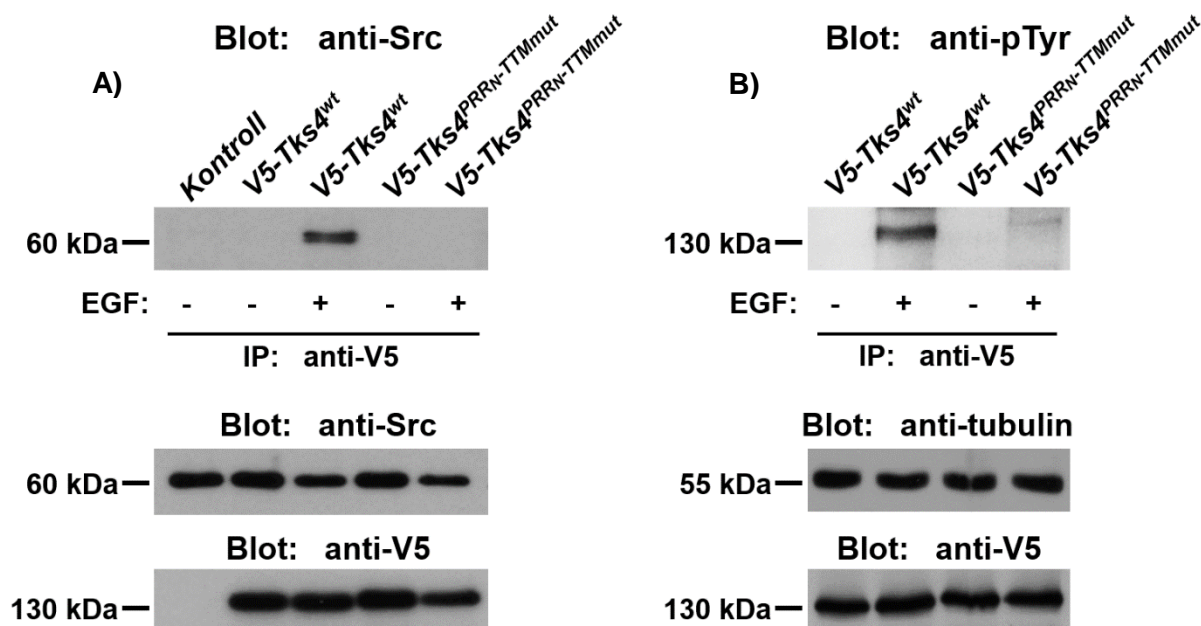
6.6 Az EGF-stimuláció hatására kialakuló Tks4-Src interakció vizsgálata COS7 sejtekben

Korábban laborunknak már sikerült kimutatni, hogy EGF kezelés hatására az Src indukálható módon asszociálódik a Tks4-el, amely a kináz szubsztrátja [4], azonban az akkor elvégzett kísérletek nem szolgáltak információval arról, hogy milyen az interakció jellege (direkt vagy indirekt) és mely domének vagy lineáris motívumok vesznek részt a két fehérje közötti kapcsolat kialakításában.

Az előbbieken leírt kölcsönhatási mechanizmus sejten belüli igazolásához COS7 sejteket transzfektáltunk V5-jelölt vad típusú (V5-Tks4^{wt}) vagy egy olyan mutáns Tks4 konstrukcióval (V5-Tks4^{PRR_N-TTM^{mut}}), amelyben mind a prolinban gazdag régiót, mind a tirozint tartalmazó motívumot a „Plazmidok és konstrukciók, irányított mutagenézis” pontban ismertetett módon megváltoztattuk. Annak érdekében, hogy a kísérletet ne zavarják meg a szérumban található egyéb növekedési faktorok, a sejteket egy éjszakán keresztül szérummentes médiumban tartottuk, majd másnap a tenyészetek egy részét EGF-el kezeltük. A kezelés 10 percig tartott, mivel tapasztalataink szerint az aktivált EGFR által kiváltott események nagy része ennyi idő alatt lezajlik. A Tks4 fehérjét a rajtuk lévő V5 címkét kihasználva anti-V5 agaróz szuszpenzió segítségével immunprecipitáltuk, majd a mintákat anti-Src, anti-pTyr és anti-V5 ellenanyaggal hívtuk elő.

A korábbi eredményeinknek megfelelően [4] a vad típusú Tks4 és az Src között láthatóan létrejött az interakció, miután megtörtént az EGF kezelés. Ezzel szemben a mutáns Tks4 (V5-Tks4^{PRR_N-TTM^{mut}}) nem volt képes kötődni a kinázhoz a stimulust követően sem (36. ábra). Mivel az már ismert, hogy a Tks4 három helyen is foszforilálódik az Src által, kíváncsiak voltunk, hogy ezt a folyamatot hogyan befolyásolja a fehérjében található Src kötő motívumok mutációja. Ahogy az anti-foszfotirozin immunobloton megfigyelhető, az EGF kezelés hatására a vad típusú Tks4 erőteljesen foszforilálódik, ellenben a mutáns fehérjével, amely gyakorlatilag változatlan maradt (36. ábra).

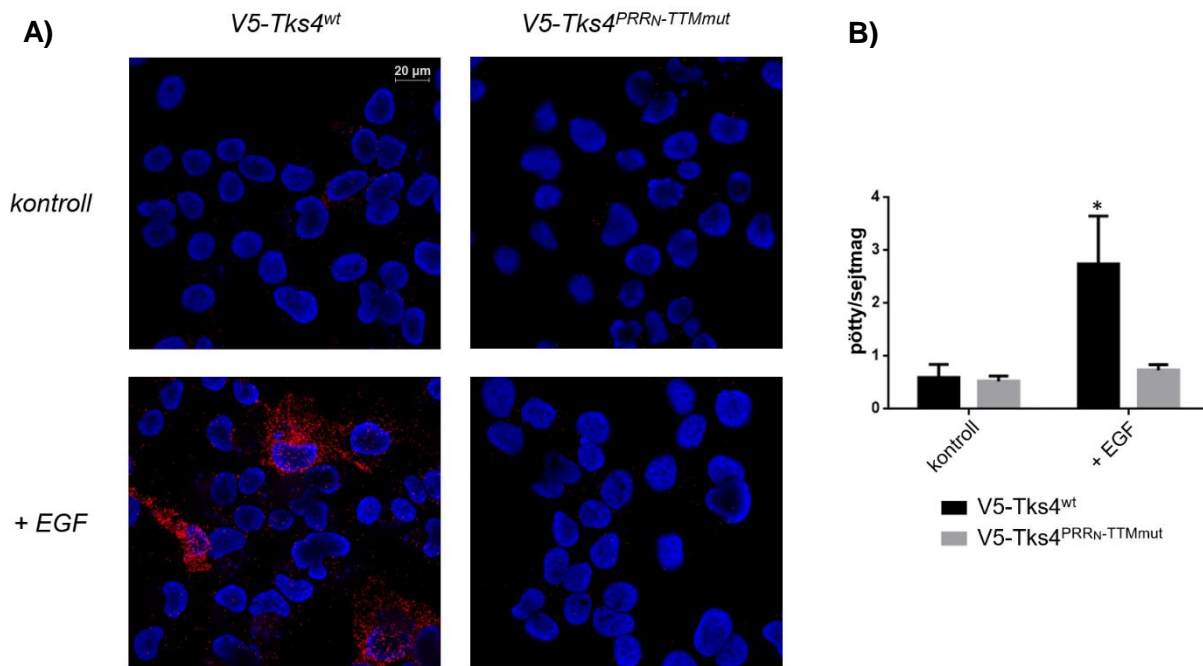
Az előbbi sejtes vizsgálatok is arra utalnak, hogy valóban a PRR_N-pTTM régióknak van meghatározó szerepe az interakció létrehozásában, illetve a Tks4 foszforilációjában. Továbbá a Tks4 foszforilációjának erőteljes csökkenése a kötőhelyek elrontásakor arra utal, hogy a direkt fizikai kapcsolat hiányában az Src nem képes érdemben foszforilálni a Tks4-ben található másik két tirozint (25-ös és 373-as tirozinok), valószínűleg azért, mert így az aktivált Src kináz-doménje körül a szubsztrát nem éri el a hatékonysághoz szükséges koncentrációt.



36. ábra – A sejtek EGF kezelését követően a PRR_N-TTM helyeken mutáns Tks4 nem volt képes foszforilálódni és asszociálódni a Src-vel. A COS7 sejtek V5-Tks4^{wt} vagy V5-Tks4^{PRR_N-TTM^{mut}} tranziens transzfekcióját, majd a szérumban inkubálását követően a sejtek EGF-el lettek stimulálva (harmadik és ötödik sáv az A panelen; második és negyedik sáv a B panelen), vagy kezeletlenek maradtak (második és negyedik sáv az A panelen; első és harmadik sáv a B panelen). A Tks4 immunoprecipitációja anti-V5 antitesttel, valamint a minták elemzése anti-Src, anti-pTyr, anti-tubulin és anti-V5 antitesttel történt. Az A panelen az első sáv mutatja a nem transzfektált sejtek lizátumából származó fehérjék nem specifikus kötődését a V5-gyöngyökhöz. A minták és a gélek kezelésének és futtatásának kísérleti körülményei azonosak voltak.

Egy másik módszerrel is szeretnénk alátámasztani az immunprecipitációs kísérletek eredményeit, így a Tks4-Src interakció kialakulását *in situ* teszteltük élő COS7 sejtekben Duolink proximitás ligációs esszével (DPLA), amely fluoreszcens pöttyöket generál, ha a célfehérjék megfelelő közelségbe kerülnek egymáshoz. A tenyészeteket ebben az esetben is V5-Tks4^{wt} vagy V5-Tks4^{PRR_N-TTM^{mut}} konstrukciókkal transzformáltuk és egy éjszakán keresztül szérumban tartottuk. Ezt követően az EGF kezelt vagy kezeletlen sejteket monoklonális egér anti-V5 és poliklonális nyúl anti-Src ellenanyagokkal inkubáltuk, majd a gyártó leírása szerint elvégeztük a detektáláshoz szükséges lépéseket. A vad típusú Tks4 jelenlétében az EGF stimulus, a kontroll (kezeletlen) sejtekhez képest, a fluoreszcens pöttyök számának jelentős növekedését idézte elő (37. ábra). Ez nem mondható el a mutáns konstrukciót tartalmazó sejtekről, ugyanis ebben az esetben a fluoreszcens pöttyök mennyisége nem változott a kezelés hatására sem (37. ábra).

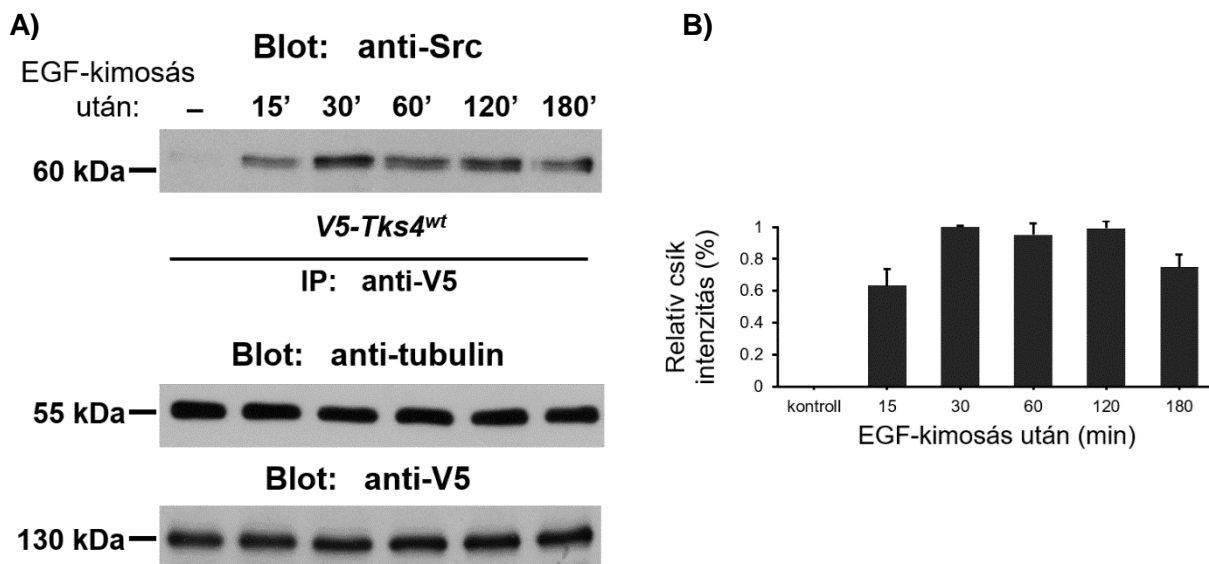
Összegezve, az elvégzett kísérletek erősen azt sugallják, hogy az EGF stimuláció hatására sejten belül kialakuló Src és Tks4 komplex valószínűleg az Src SH3 és SH2 doménjei, illetve a Tks4 PRR_N és pTTM szakaszai által jön létre.



37. ábra – A Tks4 és Src EGF-függő asszociációjának kimutatása proximitás ligációs vizsgálattal COS7 sejtekben. A) A COS7 sejtek V5-Tks4^{wt} (A panel, bal oldali képek) vagy V5-Tks4^{PRRN-TTMmut} (A panel, jobb oldali képek) tranziens transzfekcióját a szérummentes médiumban történő éheztetés követte. A sejtek EGF-el lettek kezelve (alsó képek), vagy kezeletlenek maradtak (felső képek), majd a Duolink proximitás ligációs vizsgálat (DPLA) nyúlból származó anti-Src és egérből származó anti-V5 ellenanyagok felhasználásával történt. A sejtmagokat (kék) a DPLA-hoz tartozó rögzítő médiumban található DAPI tette láthatóvá. A Tks4 és Src közötti interakciót a piros pöttyök jelzik. B) A DPLA pöttyök számolása a V5-Tks4^{wt} és V5-Tks4^{PRRN-TTMmut} sejtekből véletlenszerűen kiválasztott képeken történt, amelyek mintaként összesen 200-200 sejtmagot tartalmaztak. Az oszlopdigrammok három független minta pötty/sejtmag arány átlagát mutatják. *p<0.05. A hibasávok a szórást jelölik.

Az alapján, hogy a Tks4 és Src közötti interakció igen erősnek bizonyult, felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon mennyi ideig kimutatható a fehérje komplex. Ennek megválaszolásához V5-Tks4^{wt} konstrukcióval transzfektált COS7 sejteket 10 percig kezeltünk EGF-el, utána a médiumot lecseréltük EGF- és szérummentes médiumra, majd adott idő elteltével begyűjtöttük a mintákat. Miután a lizátumokból anti-V5 agaróz segítségével immunprecipitáltuk a V5 jelölt Tks4 fehérjét, a megkötött Src kimutatása következett. A membránokat anti-V5 és anti-tubulin ellenanyagokkal is előhívtuk, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az összes mintából egyforma mennyiséget alkalmaztunk az immunoblot során. A kísérletből kiderült, hogy az interakció mértéke körülbelül 30 perc elteltével éri el a maximumát és legalább 180 percig tart (38. ábra).

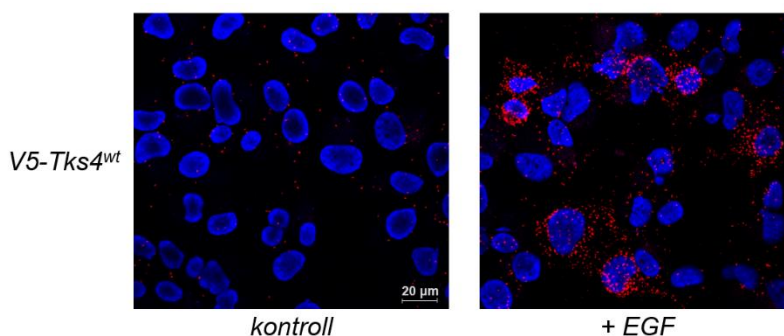
A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen az Src aktivációs állapota, miután interakcióba lép a Tks4 állványfehérjével.



38. ábra – A Tks4 és Src asszociációjának időbeli lefolyása az EGF kezelést követően. A COS7 sejtek V5-Tks4^{wt} tranziens transzfekcióját a szérumban történő éheztetés követte. A sejtek EGF kezelése 10 percig tartott, majd a médium ismét szérumban és EGF mentes médiumra lett cserélve. A lizátumok a megadott idő intervallumok után lettek begyűjtve. A) A Tks4 immunoprecipitációja anti-V5 antitesttel, valamint a minták elemzése anti-Src, anti-tubulin és anti-V5 antitesttel történt. A minták és a gélek kezelésének és futtatásának kísérleti körülményei azonosak voltak. B) Az előhívott Src-csíkok intenzitásának meghatározása az ImageJ program segítségével történt (n=2). A hibaszávok a szórás jelölik.

Ehhez egy foszfospecifikus pY418-Src antitestet alkalmaztunk a proximitás ligációs vizsgálat során, kihasználva azt, hogy az Src kináz-doménjében található foszforilált 418-as (humán Src esetében 419) tirozin ismert indikátora az aktív enzimnek [191]. Az elkészült képek alapján a Tks4 fehérjével asszociált Src a 418-as tirozinon foszforilált, tehát a kináz aktív állapotban van jelen az EGF stimuláció hatására kialakuló komplexben (39. ábra).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az EGF jelpálya bekapcsolását követően az aktivált Src képes stabilan összekapcsolódni a Tks4 fehérjével, amely a kináz szubsztrátja.



39. ábra – Az Src aktivációs állapota a Tks4-el alkotott komplexében. Az EGF-kezelt (jobb oldali kép) vagy kezeletlen (bal oldali kép) COS7 sejteken végzett Duolink proximitás ligációs vizsgálat nyúl anti-Src (pY418) és egér anti-V5 ellenanyagok felhasználásával. A sejtmagokat (kék) a DPLA-hoz tartozó rögzítő médiumban található DAPI tette láthatóvá. A Tks4 és az aktív Src közötti interakciót a piros pöttyök jelzik.

7 DISZKUSSZIÓ

A Tks4 állványfehérjét először az adipocita differenciáció mechanizmusának tanulmányozása során fedezték fel [17], ám később kiderült, hogy különböző biológiai folyamatokban is szerepet játszik. Többek közt részt vesz a podoszómák, invadopódiumok létrehozásában [1], a reaktív oxigén származékok homeosztázisában [3], az EGF jelpályában [4], [200], valamint hiányához köthető egy autoszomális recesszív rendellenesség a Frank-ter Haar szindróma (FTHS) kialakulása [5], [101]. Bár a Tks4 funkciójáról már vannak részleges ismereteink, az FTHS tüneteit kialakító mechanizmus továbbra sem ismert.

Annak érdekében, hogy minél átfogóbban tanulmányozhassuk a Tks4 fehérje szerepét, laborunk a Cre-LoxP rendszer segítségével Tks4-hiányos egereket hozott létre. Jelenleg létezik két másik egér modell is, amelyek szintén az *SH3PXD2B* génben hordoznak mutációt [5], [65]. Az általunk generált egerek a C57/Bl6 törzsből származnak és esetükben a fehérjét kódoló gén 5-ös és 6-os exon deléciója okozza a Tks4 hiányát. Ezzel szemben a másik két egér egészen más genetikai háttérrel rendelkezik. Iqbal és munkatársai a kísérleti állatokat géncsapda módszerrel hozták létre, amely során a 3-as és 4-es exon közötti inszercióval inaktiválták a gént. Az így kapott egerek kevert genetikai háttérrel tarthatóak fenn (C57BL6/a129SvJ) [5]. A másik esetben Mao és munkatársai a spontán mutációval kialakult B10-SH3PXD2B^{nee} törzsből származó egerekkel rendelkeznek, amelyeknél a gén utolsó exonjában található, egy bázispárnyi deléció miatt kialakuló korai stop kodon a Tks4 hibás átírását eredményezi [98]. Annak ellenére, hogy az egér modellek genetikai háttere eltér egymástól, az *SH3PXD2B* gén sérülése mindhárom esetben nagyon hasonló fenotípust okoz, illetve a jelentkező tünetek ugyanolyanok, mint a Frank-ter Haar szindrómás betegek esetében [101] (2. táblázat). Ahogy korábban már említésre került, a Tks4 szerepet játszik a podoszómák keletkezésében, amely folyamathoz hozzájárulnak a mátrix metalloproteázok is. Mindez azért érdekes, mert a mátrix metalloproteáz génkiütött egerek között akad olyan, amely hasonló deformitásokkal rendelkezik, mint a Tks4-hiányos egerek [201].

A leírt fenotípusok alapján megfigyelhető, hogy a betegséghez köthető abnormalitások leginkább a mesenchymalis eredetű szövetekben jelentkeznek (csont, porc, zsír), így valószínűsítettük, hogy a kórkép kialakulásának okai között lehetnek olyanok, amelyek a mesenchymalis őssejtek (MSC-k) valamilyen működési zavarához vezethetőek vissza. Ezzel összefüggésben az egerek csontvelőjéből izolált MSC-k szolgáltak a sejtek differenciációs képességére irányuló kísérletek alapjául. A vizsgálatokat megelőzően szükségeszerű a kinyert és tenyésztett kultúrák karakterizálása a sejtfelszíni markerek analízisével.

	Tks4 -/- egerek (C57Bl6 törzs)	"nee" egerek (B10.A-H2h4/(4R)SgDvEg törzs)	SH3PXD2B null egerek (kevert háttér)
Az SH3PXD2 gén mutációja:	<i>frameshift mutáció az 5. és 6. exon eltávolítása miatt</i>	<i>frameshift mutáció a 13. exonban</i>	<i>inszcrció a 3. és 4. exon között</i>
kisebb testméret	megfigyelt	megfigyelt	megfigyelt
mozgásbeli problémák	megfigyelt	nem tesztelt	nem tesztelt
kiemelkedő homlok	megfigyelt	megfigyelt	megfigyelt
kiugró, deformált szemek	megfigyelt	megfigyelt	megfigyelt
veleszületett zöldhályog	nem tesztelt	zavaros szaruhártya	megfigyelt
megrövidült orrcsont	megfigyelt	megfigyelt	megfigyelt
szív problémák	nem tesztelt	nem tesztelt	megfigyelt
hajlott, rövidebb csöves csontok	megfigyelt	rövidebb csontok	nem hajlott
kifózis	megfigyelt	megfigyelt	megfigyelt
csökkent csont sűrűség	nem tesztelt	megfigyelt	nem tesztelt
csökkent zsír mennyiség	megfigyelt	megfigyelt	megfigyelt
termékenység	terméketlen	terméketlen	nem tesztelt
hallás károsodás	nem tesztelt	megfigyelt	megfigyelt

2. táblázat – A laborunk által előállított Tks4-hiányos egerek fenotípusának összehasonlítása a másik kettő, SH3PXD2B génjében mutációt hordozó egér törzsszel. Az egér modellek eltérő genetikai háttérének ellenére, az SH3PXD2B gén sérülése mindhárom esetben nagyon hasonló fenotípust okoz.

Az általunk fenntartott génkiütött és vad típusú tenyészetek mindegyike megfelelt az MSC-kre vonatkozó, International Society for Cellular Therapy által felsorolt kritériumoknak [124], valamint összevethetőek más munkacsoportok által alkalmazott egerekből származó MSC-kkel [178], [179]. A sejtfelszíni antigének expresszióját elemezve észrevehető, hogy a vad típus sejtek pozitívabban Sca-1-re, mint a génkiütött sejtek. Ez a megfigyelés utalhat a Tks4-hiányos egerek csontját érintő rendellenességekre, mivel az Sca-1 mutáns egerek esetében az idő múlásával súlyosbodó csonttritkulást állapítottak meg, amely a fehérje hiányához volt köthető, illetve kimutatták az Sca-1 szabályozó szerepét az oszteoklasztok differenciációjában [202].

A csontok megfelelő fejlődéséhez eredményeink szerint úgy tűnik elengedhetetlen a Tks4 jelenléte, ezt támasztja alá a csont irányú differenciációs kísérletek során a kalcium felhalmozódásának nyomon követése Alizarin Red-S festéssel, valamint két fő oszteogén transzkripciós faktor, RunX2 és Osterix, kifejeződésének vizsgálata. A RunX2 egy multifunkcionális transzkripciós faktor, amely a kondrociták, oszteoblasztok differenciációján és több extracelluláris mátrix fehérjét kódoló gén expresszióján keresztül szabályozza a csontváz fejlődését, valamint esszenciális a pluripotens mesenchymalis sejtek csont irányú elköteleződéséhez [203]. A RunX2 által kiváltott oszteogén elköteleződést követően egy másik fő transzkripciós faktor, az Osterix indukálja tovább az oszteoblaszt differenciációt. Mindkét fehérje hiánya komoly csontfejlődési rendellenességeket idéz elő. [204]. A Tks4 génkiütött egerekből izolált MSC-kben a RunX2 és az Osterix is nagymértékben alul expresszált, amely

hozzájárulhat a differenciációs folyamat gátlásához, illetve a vázrendszert érintő deformitások kialakulásához.

A csont mellett a zsír irányú differenciáció is sérült a Tks4-hiányos MSC-k esetében. Ezt szemlélteti az Oil red O festésnél tapasztalt lipid cseppek hiánya, valamint két adipogén marker, PPAR γ és adiponektin, vad típustól eltérő expressziós szintje. A PPAR γ szabályozza a zsírsav raktározást és glükóz metabolizmust, valamint az általa aktivált gének stimulálják a zsírsejtek lipid felvételét és adipogenezisét. Két ismert izoformája a PPAR γ 1, amely szinte minden típusú szövetben előfordul, és a PPAR γ 2, amely kifejezetten az adipocitákra jellemző [184]. Esetünkben megfigyelhető, hogy a PPAR γ 1 mindkét MSC kultúrában expresszálódik, míg a PPAR γ 2 csak a vad típusú sejtekben fejeződik ki. Az adiponektin a zsírszövetek által specifikusan előállított fehérje hormon, amely különböző metabolikus folyamatok modulációjában vesz részt, mint a glükóz vagy zsírsav anyagcsere [185]. A differenciációs kísérletünk során a vad típusú MSC-knél pár nap elteltével megindul az adiponektin termelése, míg ez a mutáns sejteknél később és jóval kisebb mértékben történik meg. A Tks4 szerepét a zsír irányú differenciációban tovább erősíti a lipid-regulációs gének expressziós mintázatának meghatározása. Ebből a vizsgálatból kiderült, hogy az adipogén indukció a vad típusú MSC-kben 19 lipid-metabolizmus szempontjából fontos gén expressziójának szignifikáns fokozódását váltja ki, ezzel szemben ez a hatás elmarad a Tks4-hiányos MSC-knél, mivel ebben az esetben nem volt mérhető érdemleges változás.

A Tks4 új funkciójának felderítésre irányuló eddigi kísérletek azt mutatják, hogy a Tks4 fontos szerepet játszik a csontvelői mesenchymalis őssejtek csont és zsír irányú differenciációs folyamataiban. A fehérje hiányában az MSC-k differenciációja sérül, amely esetleg befolyásolhatja a mutáns egerek és a Frank-ter Haar szindrómás betegek fenotípusának kialakulását. Ám az őssejtek differenciációjához kapcsolódó jelátvitelben a Tks4 pontos mechanizmusának feltáráshoz a jövőben további vizsgálatokra van szükség.

Laborunk korábban kimutatta, hogy a rokon Tks5 állványfehérjéhez hasonlóan [200], a Tks4 is közreműködik az EGF jelátviteli útvonalban. COS7 sejtekben, az EGF stimulációt követően az Src kináz foszforilálja a Tks4-et, azonban a Tks4 kapcsolata az EGFR/Src komplexszel ellentmondásos volt, valamint az interakció természete és biokémiai tulajdonságai is tisztázatlanok voltak [1], [4]. A Tks4 és Src közötti viszony megfejtéséhez szükséges volt meghatározni, hogy a két fehérje direkt fizikai kölcsönhatásban áll-e egymással, és ha igen, akkor ezt pontosan melyik fehérje-szakaszok teszik lehetővé.

A részletes szekvencia analízis alapján a Tks4-ben csupán egy foszfortirozin-tartalmú, teljes mértékben az Src-SH2 doménre specifikus lineáris motívum (Tks4-TTM) [155], és hét

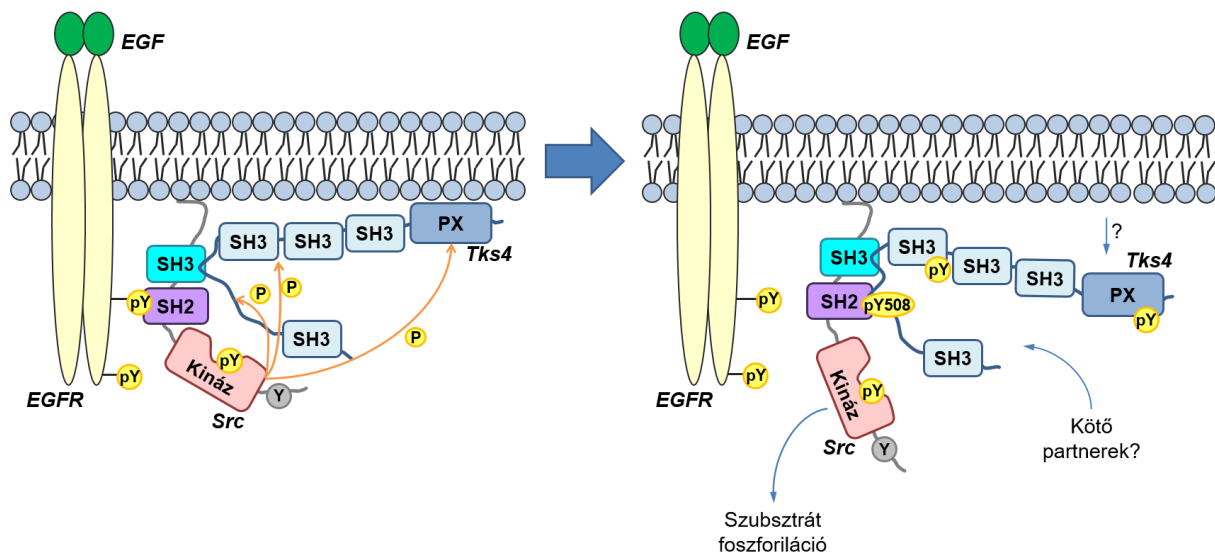
potenciális SH3-kötő prolinban gazdag régió található. A vizsgált rendezetlen szakaszon belül, a Tks4-TTM-től N-terminális irányban lévő egyetlen prolinban gazdag régió (Tks4-PPR_N) figyelemre méltó hasonlóságot mutat az Src-SH3 által preferált ismert kötő motívumokkal [173]. A szekvencia elemzés alapján már feltételezhető, hogy közvetlen kapcsolat áll fenn az Src és Tks4 között, amely az előbb említett két motívumnak köszönhetően jön létre (PPR_N és TTM). Ezt a feltételezést támasztják alá a rekombináns fehérje fragmensekkel elvégzett *in vitro* kísérletek, amelyek során a prediktált prolinban gazdag régió (PSRPLPDAP, 466-474 aminosavak) képes volt kötődni az Src-SH3-hoz, miközben a foszfortirozint tartalmazó motívum (pYEEI, 508-511 aminosavak) kölcsönhatásba tudott lépni az Src-SH2-vel. A fluoreszcencia polarizációs mérések esetében tapasztalt szinergikusan megnövekedett kötési erősség, amely az aviditási effektushoz hasonló, egyértelműen a két kötőhelyes interakció kialakulását mutatja [199]. Mindez csak úgy valósulhat meg, hogy az egyes motívumokat összekötő szakasz hossza megfelel az Src SH3 és SH2 domének közötti optimális távolságnak. Ha a linker rövidebb, a két motívum két különböző molekulának a megfelelő doménjével léphet interakcióba, vagy versenghetnek egy molekulán belül a kötőhelyekért, mivel ugyanazon molekulán belül az egyidejű kötődés elérhetetlenné válik a motívumok számára [205]. Ebben az esetben nem alakul ki a szinergikus kötődés, ehelyett az asszociált fehérjék oligo- és multimereket képeznek, a koncentrációjuktól és affinitásuktól függően. Ha a motívumok túl messze vannak egymástól, akkor úgy viselkednek, mintha függetlenek lennének, mivel az egyik kötődése nem korlátozza a másik szabad mozgását azzal, hogy azt a megfelelő kötőhely közelében tartja. Ez alapján a két molekula közötti kötődési erősség csak enyhén vagy egyáltalán nem változik [199].

Az EGF vagy PDGF stimuláció hatására összeálló Src-szubsztrát komplex képződésének időbeli lefolyását már vizsgálták néhány Src-kötő partner esetében, mint az MVP (major vault protein) és RACK1 (receptor of activated protein C kinase 1) [206], [207]. Megfigyelték, hogy az SH2 doménen keresztül létrejövő kapcsolat néhány perc után eléri a maximumát, majd visszatér az alap szinthez, például ez az MVP-nél 15, a RACK1-nél pedig 5 perc. Ezzel szemben a Tks4-Src esetében a disszociációs konstansok alapján a kötési affinitások fokozott erőssége (Src-SH3/Tks4-PPR_N: ~30 μ M, Src-SH2/Tks4-pTTM: ~50 nM, Src-SH3-SH2/Tks4-PPR_N-pTTM: ~3nM) egyértelműen azt mutatja, hogy a két fehérje alkalmas arra, hogy a Tks4 foszforilációját követően rendkívül stabil komplexet hozzanak létre. Ez a nagy affinitású kölcsönhatás fontos lehet ahhoz, hogy a Tks4 foszforilált 508-as tirozinja hosszabb ideig elérhetetlen legyen a foszfatázok számára, ezzel támogatva az aktivált Src és Tks4 komplex fenntartását az EGF-el stimulált sejtekben.

Az Src kinázokról már ismert, hogy az aktivációjukat a megfelelő ligandumok SH2 és/vagy SH3 doménekhez való kötődése váltja ki [151], [191]. Példaként, az Src aktivációját előidézi az autofoszforilált EGF vagy PDGF receptorok és az SH2 domén között fellépő interakció [208]–[210]. Számos másik szubsztrát is tartalmaz Src SH2 és SH3 kötőmotívumokat, mint a p110/AFAP1 [196], [211], a p130CAS [195], [212], [213] és a FAK [196], [211]. Az eredményeink összhangban vannak az előbb említett példákkal, amely alátámasztja, hogy az Src/Tks4 interakcióhoz szükséges a kináz SH3 és SH2 doménje is. Érdekes módon, az Src és a korábban azonosított szubsztrátjai (pl. FAK) közötti tandem interakció nem tűnt szinergikus két kötőhelyes kötődésnek [191], [214], azonban a szerzők által leírt „anti-kooperativitást” magyarázhatja az Src kötött állapotában a motívumokat összekapcsolódó régió korlátozott mozgásához társuló entrópikus hátrány. Az így kialakult entrópikus hátrány gyengébb kötődést eredményez, mint amit az ideális összekötő szakasz esetében elvárnánk. Egy SH3-kötő motívum általában gyenge és tranziens interakciót alakít ki a kinázzal, amely a szubsztrát felismeréshez szükséges [215]. A szubsztrátban egy SH2 ligandum, különösen az SH3 motívummal tandem elhelyezkedésben, nagy affinitású kötőhelyként szolgál a kináz számára. A kináz az SH2 és SH3 doménjeinek komplexben tartásával hosszabb ideig megőrzi az aktivitását, mivel így az autoinhibícióhoz szükséges intramolekuláris interakciók nem tudnak létrejönni [215]. Ilyen módon az aktivált kináz processzíven foszforilálhatja több helyen az interakciós partnerét, vagy a komplexben résztvevő többi fehérjét [190]. A processzív foszforiláció jelenségét már számos Src szubsztrát esetében megállapították, amely során az Src a szubsztrátjához kötött állapotban marad, miközben több körben katalizálja a tirozinok foszforilációját. Kimutatták már, hogy a p130CAS C-terminális prolinban gazdag régiójának kötődése az Src-SH3-hoz előfeltétele a fehérjében található számos tirozin egymást követő foszforilációjának [216]. Továbbá a foszfospecifikus antitestekkel végzett kísérletek alapján a cortactin szekvenciájában az Y421F mutációja megakadályozza az 466-os pozícióban lévő tirozin foszforilációját [217], [218]. A Tks4-et az Src három helyen foszforilálja, a 25-ös, a 373-as és az 508-as tirozinokon [1], ezért valószínűsíthető, hogy az Y508 foszforilációját követően kialakul a tandem interakció, majd megtörténik a másik két tirozin foszforilációja is. Az Y25-ös a Tks4 PX, a 373-as a harmadik SH3 doménjében helyezkedik el, ebből adódóan ezek a tirozinok, mint szubsztrátok, rosszabb pozícióban vannak az Y508-hoz képest, amely egy hosszú rendezetlen régióban található. Habár nagyon csábító az a feltételezés, hogy ezek a foszforilációs események szabályozhatják a PX domén lipid kötését vagy az SH3 domén interakciós képességét, jelenleg nincs információnk ezeknek a poszttranszlációs módosításoknak a lehetséges szerepéről.

Korábbi eredményeink szerint az Src jelenléte szükséges a Tks4 és EGFR asszociációjához [4]. A Tks4 tirozin-foszforilációjáért az Src felelős, mivel az aktív EGFR erre közvetlenül nem képes. Fontos megjegyezni, hogy az EGFR autofoszforilációját és aktivációját követően az Src az SH doménjén keresztül képes kötődni a receptorhoz és így aktiválódni [208]. Felmerül viszont az a kérdés, hogy az EGFR-asszociált és aktivált Src később az SH2 és SH3 doménjeivel vajon milyen mechanizmus révén lép interakcióba a Tks4-el. Az irodalmi adatok és a saját eredményeink alapján az alábbi modellt feltételezhetjük (40. ábra). Nyugalmi állapotban lévő sejtekben a Tks4 főként a citoszolban lokalizálódik. Az EGF stimuláció hatására a dimerizált és autofoszforilált EGFR megköti és aktiválja az Src kinázt, elsődlegesen a foszfortirozin/SH2 domén által közvetített interakción keresztül. Az aktivált Src a szabad SH3 doménjével kölcsönhatásba lép a Tks4-el. Ezután az Src foszforilálni tudja a Tks4 508-as tirozinját, majd az Src-SH2 elengedheti a receptort és kötődhet a Tks4 szekvenciájában található pTTM motívumhoz, mivel ez a Tks4-PRR_N szakasszal tandem helyzetben van. A nagyon erős, szinergikus két kötőhelyes interakció miatt az Src nagy valószínűséggel inkább a Tks4-hez való kötődést részesíti előnyben az EGFR-el szemben. Az aktivált receptorhoz később azonban egy újabb Src molekula kötődhet, így újakezdve az előbbi ciklust és stabilizálva a jelet.

Bár számos Src szubsztrát esetben kimutatták, hogy a prolinban gazdag régiójuk képes kötődni az Src családba tartozó kinázok SH3 doménjéhez, ezáltal stabilizálva a kináz aktív konformációját, mégis a gyenge kölcsönhatás ($K_d \sim 30 \mu M$) a Tks4-PRR_N és Src-SH3 között önmagában nem tűnik elegendőnek az enzim aktivációjának elősegítéséhez. Példaként, a Cask-kötő fehérje (Cbp) prolinban gazdag motívumával képes megszüntetni számos Src kináz SH3-mediált intramolekuláris interakcióit, ezzel megindítva a kináz aktivációját [219]. A HIV-1 Nef fehérje kötődése a Hck SH3 doménjéhez képes aktiválni a kinázt, amely szintén az Src család tagja [220], [221]. Ezzel szemben az Src erős kötődésének előfeltétele a Tks4 esetében a Y508 foszforilációja. Úgy tűnik a PRR_N régió a nem-foszforilált Tks4-ben csak az EGFR-kötött Src szabad SH3 doménjéhez kötődik és önmagában nem képes kinyitni a kináz autoinhibált konformációját. Ám az erős, két kötőhelyes interakció az Src és a foszforilált szubsztrátja között a kináz aktív konformációjának hosszú távú stabilizációját eredményezi, lehetővé téve újabb szubsztrátok foszforilációját. Fontos megjegyezni, hogy nem zárhatjuk ki egyéb fehérjék jelenlétét sem *in vivo*, amelyek tovább stabilizálhatják, szabályozhatják vagy módosíthatják a fent említett interakciókat. Mindazonáltal, a jövőben további kísérletek szükségesek annak érdekében, hogy megértsük a Tks4 közreműködése által az Src kináz aktivációját az EGF jelátviteli útvonalban.



40. ábra – Az EGF stimulációt követően, a Tks4-Src komplex kialakulásának egy lehetséges modellje. Nyugalmi állapotban lévő sejtekben a Tks4 túlnyomórészt a citoplazmában lokalizálódik. Az EGF stimulációra adott válasz során az autofoszforilált EGFR aktiválja az Src tirozin kinázt azáltal, hogy a kináz SH2 doménje kötődik a receptor egyik C-terminális tirozinon-foszforilált motívumához. Ezt követően a Tks4 prolinban gazdag régiója kölcsönhatásba léphet az Src szabadrá vált SH3 doménjével, miközben az Src-SH2 továbbra is az EGFR-hez kötődik. Az aktivált Src foszforilálhatja a Tks4-ben található 508-as tirozint. Ezután az Src-SH2 elengedheti a receptort és kötődhet a Tks4 foszforilált, pY508-at tartalmazó SH2-kötő motívumához. Mivel a Tks4-el kialakult szinergikus kötődés erősebb, mint az SH2 domén kötődése az EGFR-hez, így valószínűbb, hogy hosszabb távon az Src az SH3 és SH2 doménjével egyidejűleg inkább a Tks4-hez kötődik, ahelyett, hogy összekötőként szolgálna a receptor és Tks4 között. A továbbiakban az Src foszforilálhatja a Tks4-ben lévő 25-ös és 373-as tirozinokat, valamint az EGFR újabb kinázt köthet meg. Végül, a rendkívül erős, hosszan tartó interakció az Src és Tks4 között a kináz aktív állapotának stabilizációját eredményezheti, amely lehetővé teszi további szubsztrátok foszforilációját.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

A Tks4 állványfehérje (tirozin kináz szubsztrát négy SH3 doménnel) fontos szerepet játszik a podoszómák kialakulásában, az EGF jelátvitelben és a reaktív oxigén származékok termelődésében. A Tks4 hiányához köthető egy ritka genetikai betegség, a Frank-ter Haar szindróma, amely esetében az embrionális és posztnatális fejlődés során a legtöbb rendellenesség a mesenchymalis eredetű szövetekben jelentkezik.

A mesenchymalis őssejtek (MSC-k) elköteleződésének folyamata széleskörűen tanulmányozott, ám még nem teljesen ismert. Fontos ezért megérteni, mely molekulák, illetve szabályozási mechanizmusok járulnak hozzá az őssejtek differenciált sejtekké történő átalakulásához. Ebben a tanulmányban célunk volt annak vizsgálata, hogy a Tks4 mutációja miként hat a multipotens csontvelői MSC-k differenciációs potenciáljára. Ehhez létrehoztunk egy C57Bl/6 Tks4 génkiütött egér törzset, valamint a vad típusú és Tks4^{-/-} egerekből izolált MSC-ket karakterizáltunk a differenciációs vizsgálatokhoz. Megállapítottuk, hogy a vad típusúhoz képest a Tks4-hiányos MSC-k csökkent csont és zsír irányú differenciációs képességgel rendelkeznek. Az adipogén indukció során a lipid-regulációs gének expressziós mintázatának tanulmányozása azt mutatta, hogy az adipogén transzkripció faktorok, valamint a lipid cseppek kialakulásáért, a szterol és zsírsav metabolizmusért felelős gének kifejeződése késleltetett vagy csökkent a Tks4^{-/-} MSC-kben. Összefoglalva, ezek az eredmények a Tks4 új szerepére világítanak rá az MSC-differenciáció szabályozásában.

Csoportunk korábban kimutatta, hogy a Tks4 részt vesz az epidermális növekedési faktor (EGF) jelátvitelében és kapcsolatba kerül az Src-vel, amely ennek az útvonalnak egy központi szereplője. Azonban eddig az interakció jellege nem volt tisztázott. A dolgozatban bemutatjuk, hogy a Tks4 és Src közvetlenül kötődik egymáshoz, valamint fényt derítünk a komplex képződéshez szükséges molekuláris mechanizmus részleteire. Az *in vitro* kísérletek és a sejtes alapú vizsgálatok eredményei szerint a Tks4-ben a prolinban gazdag SH3-kötő (PSRPLPDAP, 466-474 aminosavak) és a közeli foszfortirozin-tartalmú SH2-kötő (pYEEI, 508-511 aminosavak) motívumok felelősek az Src kötődéséért. Ezek a motívumok kölcsönhatásba lépnek az Src SH3 és SH2 doménjével, amely a kötődés szinergikus erősödéséhez és a rendkívül stabil két kötőhelyes interakció kialakulásához vezet. Az előbbiekkal összhangban megállapítható, hogy a Tks4 asszociációja az Src-vel tartós és élő sejtekben legalább három órán keresztül megmarad. A kapott eredmények előrelépést jelentenek a Tks4 és Src közötti kölcsönhatás megértéséhez, amely az EGF stimulációt követően a kináz aktív konformációját stabilizálhatja, előidézve az Src elnyújtott aktivitását.

9 ABSTRACT

The Tks4 (tyrosine kinase substrate with four Src homology 3 domains) scaffold protein plays a role in podosome formation, EGF signaling and ROS production. The dysfunction of Tks4 causes a hereditary disease called Frank-ter Haar syndrome with a variety of defects concerning certain mesenchymal tissues throughout embryonic and postnatal development.

The commitment steps of mesenchymal stromal cells (MSCs) have been widely studied but not fully understood. Therefore, it is critical to understand which molecules contribute to the conversion of stem cells into differentiated cells. In this study, we aimed to analyze how the deletion of Tks4 affects the differentiation potential of multipotent bone marrow MSCs. We generated a Tks4 knock-out mouse strain on C57Bl/6 background, and characterized MSCs isolated from wild type and Tks4^{-/-} mice to evaluate their differentiation. Tks4^{-/-} MSCs had reduced ability to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages compared to wild type. Studying the expression profile of a panel of lipid-regulated genes during adipogenic induction revealed that the expression of adipogenic transcription factors, genes responsible for lipid droplet formation, sterol and fatty acid metabolism was delayed or reduced in Tks4^{-/-} MSCs. Taken together, these results establish a novel function for Tks4 in the regulation of MSC differentiation.

Our group has recently showed that Tks4 is involved in epidermal growth factor (EGF) signaling and associates with Src, which is a central component of this pathway. However, the nature of the interaction was not clear. Here we demonstrate that Tks4 and Src bind directly to each other and elucidate the details of the molecular mechanism of this complex formation. Results of *in vitro* experiments and cell-based assays show that both a proline-rich SH3 binding motif (PSRPLPDAP, residues: 466-474) and an adjacent phosphotyrosine-containing SH2 binding motif (pYEEI, residues: 508-511) in Tks4 are responsible for Src binding. These motifs interact with the SH3 and SH2 domains of Src, respectively, leading to synergistic enhancement of binding strength and a highly stable, “bidentate”-type of interaction. In agreement with these results, we found that the association of Src with Tks4 is permanent and the complex lasts at least three hours in living cells. These results represent an advance in our understanding of the bidentate type of interaction through SH2 and SH3 domains of Src with Tks4, which may result in the long-term stabilization of the kinase in its active conformation leading to prolonged Src activity following EGF stimulation.

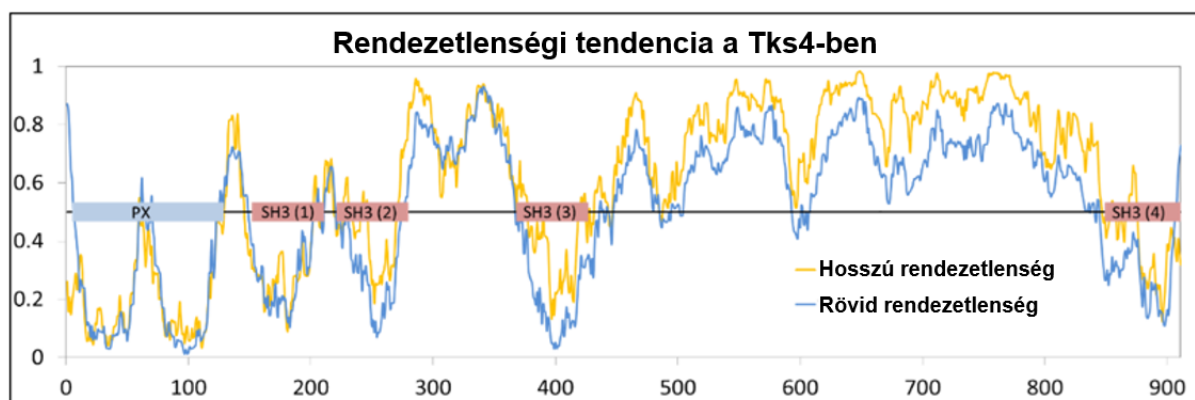
10 MELLÉKLETEK

1. melléklet – Az adipogén irányba differenciáltatott MSC-k vizsgált génjeinek listája. A táblázat tartalmazza a gének jelölését, a génfunkciók rövid leírását, valamint a TaqMan Array tálcákon használt azonosítókat.

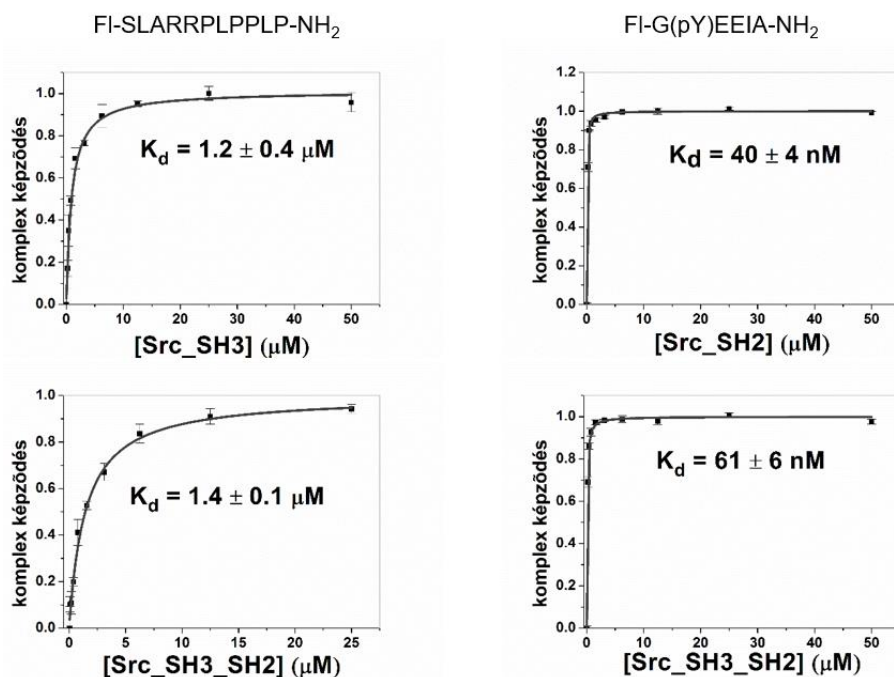
Gén jelölése:	Leírás:	Azonosító:
<i>Transzkripció faktorok:</i>		
Srebf1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	Mm01138344_m1
Lxra	NR1H3 Liver X Receptor-Alpha	Nuclear Receptor Subfamily 1, Group H, Member 3 Mm00443451_m1
Ppard	NR1C2 Peroxisome Proliferator Activator Receptor delta	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group C Member 2 Mm01305433_m1
Pparg	NR1C3 Peroxisome Proliferator Activated receptor gamma	Nuclear Receptor Subfamily 1 Group C Member 3 Mm01184322_m1
<i>Szterol metabolizmus:</i>		
Abca1	CERB ATP-binding cassette transporter A1	ATP-binding cassette sub-family A (ABC1) member 1, Cholesterol Efflux Regulatory Protein Mm01350760_m1
Lpl	Lipoprotein Lipase	Mm00434770_m1
Cd36	Cd36 scavenger receptor	CD36 antigen, Collagen Type I Receptor, Thrombospondin Receptor Mm00432403_m1
Hmgcs1	HMG-CoA-Synthase 1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 Mm00524111_m1
Insig1	Insulin induced gene 1	Mm00463389_m1
Stard4	START domain containing 4	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4 Mm00505395_m1
Acat1	MAT Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase Mm00507463_m1
<i>Zsírsav anyagcsere és lipid csepp képződés:</i>		
GK	Glycerol Kinase	Mm00433896_m1
Acadvl	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	Mm00444296_m1
FABP4	ALBP Fatty acid binding protein 4	Adipocyte Lipid-Binding Protein Mm00445878_m1
FABP5	EFABP Fatty acid binding protein 5	Epidermal-Type Fatty Acid-Binding Protein Mm00783731_s1
FADS1	LLCDL1 Fatty acid desaturase 1	Linoleoyl-CoA Desaturase (Delta-6-Desaturase)-Like 1 Mm00507605_m1
FADS2	LLCDL2 Fatty acid desaturase 2	Linoleoyl-CoA Desaturase (Delta-6-Desaturase)-Like 2 Mm00517221_m1
FADS3	LLCDL3 Fatty acid desaturase 3	Linoleoyl-CoA Desaturase (Delta-9-Desaturase)-Like 3 Mm00517643_m1
Scd1	FADS5 Stearoyl-CoA desaturase	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1, Fatty Acid Desaturase Mm00772290_m1
Hadhb	MTPB Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase beta subunit	Mm00523880_g1

Ucp2	BMIQ4	Uncoupling protein 2	Body Mass Index Quantitative Trait 4	Mm00627599_m1
Adfp	Plin2	Adipose Differentiation-Related Protein, Adipophilin	perilipin 2	Mm00475794_m1
Pla2g4a	CPLA2	Phospholipase A2, group IVA	Calcium-Dependent Phospholipid-Binding Protein	Mm00447040_m1
Ltc4s		Leukotriene C4 synthase		Mm00521864_m1
Alox12		Arachidonate 12-lipoxygenase	Platelet-Type 12-Lipoxygenase	Mm00545833_m1
Alox5ap	FLAP	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	Five-Lipoxygenase Activating Protein	Mm00802100_m1

2. melléklet – A Tks4 domén szerkezete, rendezetlen régiói, foszforilációs helyei és jóslott lineáris kötő motívumai. A felső ábra a teljes hosszúságú Tks4 rendezetlenségi tendenciáját és domén szerkezetét mutatja. Az alsó ábrán a HOGENOM adatbázisból elérhető összes Tks4 szekvencia illesztésének LOGO ábrázolása, valamint a teljes hosszúságú szekvencia PhosphoSitePlus és ELM általi elemzése látható.



3. melléklet – A fluoreszcein jelölt riporter peptidek kötési affinitásának meghatározása fluoreszcencia polarizációs mérésekkel. A fluoreszcein jelölt riporter peptideknek, FI-SLARRPLPLP-NH₂ (bal oldali panelek) és FI-G(pY)EEIA-NH₂ (jobb oldali panelek), az Src SH3, SH2 és SH3-SH2 doménekhez való kötődésének meghatározása a jelöletlen doménekkel végzett titrálások során mért fluoreszcencia polarizációs jelek nyomkövetésével. Az adatok illesztése egy olyan másodfokú egyenlettel történt, amely egy egyszerű, egy az egyhez kötődési egyensúlyt ír le. A hibasávok a három független kísérleten alapuló szórást jelölik. A triplikátumok egymástól függetlenül elkészített, egy időben vizsgált minták voltak. A disszociációs állandók az illesztés standard hibájával együtt lettek ábrázolva.



11 IRODALOMJEGYZÉK

- [1] M. D. Buschman, P. A. Bromann, P. Cejudo-Martin, F. Wen, I. Pass, and S. A. Courtneidge, “The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, no. 5, pp. 1302–1311, Mar. 2009.
- [2] D. Gianni, B. Diaz, N. Taulet, B. Fowler, S. A. Courtneidge, and G. M. Bokoch, “Novel p47(phox)-related organizers regulate localized NADPH oxidase 1 (Nox1) activity.,” *Sci. Signal.*, vol. 2, no. 88, p. ra54, Sep. 2009.
- [3] D. Gianni, C. DerMardirossian, and G. M. Bokoch, “Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation.,” *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 90, no. 2–3, pp. 164–171, 2011.
- [4] G. Bögel *et al.*, “Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 regulates epidermal growth factor-dependent cell migration.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 37, pp. 31321–31329, Sep. 2012.
- [5] Z. Iqbal *et al.*, “Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (SH3PXD2B) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome.,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 86, no. 2, pp. 254–261, Feb. 2010.
- [6] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia, “Mesenchymal stem cells in health and disease.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 9, pp. 726–36, Sep. 2008.
- [7] M. F. Pittenger *et al.*, “Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.,” *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–7, Apr. 1999.
- [8] N. E. Hynes and H. A. Lane, “ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 5, pp. 341–54, May 2005.
- [9] A. Alexa, J. Varga, and A. Reményi, “Scaffolds are ‘active’ regulators of signaling modules,” *FEBS J.*, vol. 277, no. 21, pp. 4376–4382, Nov. 2010.
- [10] L. Buday and P. Tompa, “Functional classification of scaffold proteins and related molecules.,” *FEBS J.*, vol. 277, no. 21, pp. 4348–55, Nov. 2010.
- [11] J. E. Ferrell and K. A. Cimprich, “Enforced Proximity in the Function of a Famous Scaffold,” *Mol. Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 289–291, Feb. 2003.

- [12] R. P. Bhattacharyya, A. Reményi, B. J. Yeh, and W. A. Lim, “Domains, Motifs, and Scaffolds: The Role of Modular Interactions in the Evolution and Wiring of Cell Signaling Circuits,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 75, no. 1, pp. 655–680, 2006.
- [13] R. G. Smock and L. M. Gierasch, “Sending Signals Dynamically,” *Science (80-.)*, vol. 324, no. 5924, pp. 198–203, Apr. 2009.
- [14] T. Pawson, “Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 19, no. 2, pp. 112–116, Apr. 2007.
- [15] A. Zeke, M. Lukács, W. A. Lim, and A. Reményi, “Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits,” *Trends Cell Biol.*, vol. 19, no. 8, pp. 364–374, Aug. 2009.
- [16] T. Brummer, C. Schmitz-Peiffer, and R. J. Daly, “Docking proteins,” *FEBS J.*, vol. 277, no. 21, pp. 4356–4369, Nov. 2010.
- [17] T. Hishida, T. Eguchi, S. Osada, M. Nishizuka, and M. Imagawa, “A novel gene, fad49, plays a crucial role in the immediate early stage of adipocyte differentiation via involvement in mitotic clonal expansion.,” *FEBS J.*, vol. 275, no. 22, pp. 5576–88, Nov. 2008.
- [18] Á. Lányi *et al.*, “The homolog of the five SH3-domain protein (HOFI/SH3PXD2B) regulates lamellipodia formation and cell spreading.,” *PLoS One*, vol. 6, no. 8, p. e23653, Jan. 2011.
- [19] P. V. Hornbeck *et al.*, “PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. Database issue, pp. D261-270, Jan. 2012.
- [20] C. D. Ellson, S. Andrews, L. R. Stephens, and P. T. Hawkins, “The PX domain: a new phosphoinositide-binding module.,” *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. Pt 6, pp. 1099–105, Mar. 2002.
- [21] M. Chandra and B. M. Collins, “The Phox as (PX) Domain,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 2, Springer, New York, NY, 2018, pp. 1–17.
- [22] Y. Xu, L. F. Seet, B. Hanson, and W. Hong, “The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling.,” *Biochem. J.*, vol. 360, no. Pt 3, pp. 513–30,

Dec. 2001.

- [23] R. D. Teasdale and B. M. Collins, “Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease,” *Biochem. J.*, vol. 441, no. 1, pp. 39–59, Jan. 2012.
- [24] C. A. Worby and J. E. Dixon, “Sorting out the cellular functions of sorting nexins,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 12, pp. 919–931, Dec. 2002.
- [25] Y. Xu, H. Hortsman, L. Seet, S. H. Wong, and W. Hong, “SNX3 regulates endosomal function through its PX-domain-mediated interaction with PtdIns(3)P,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 7, pp. 658–66, Jul. 2001.
- [26] G. Odorizzi, M. Babst, and S. D. Emr, “Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 25, no. 5, pp. 229–35, May 2000.
- [27] J. Schultz, F. Milpetz, P. Bork, and C. P. Ponting, “SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, no. 11, pp. 5857–5864, May 1998.
- [28] I. Letunic, T. Doerks, and P. Bork, “SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. D1, pp. D302–D305, Jan. 2012.
- [29] M. L. Cheever, T. K. Sato, T. de Beer, T. G. Kutateladze, S. D. Emr, and M. Overduin, “Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 7, pp. 613–8, Jul. 2001.
- [30] H. Hiroaki, T. Ago, T. Ito, H. Sumimoto, and D. Kohda, “Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain,” *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 6, pp. 526–30, Jun. 2001.
- [31] J. Xu *et al.*, “Structure of sorting nexin 11 (SNX11) reveals a novel extended phox homology (PX) domain critical for inhibition of SNX10-induced vacuolation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 23, pp. 16598–605, Jun. 2013.
- [32] J. Bravo *et al.*, “The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate,” *Mol. Cell*, vol. 8, no. 4, pp. 829–39, Oct. 2001.

- [33] D. Karathanassis *et al.*, “Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction.,” *EMBO J.*, vol. 21, no. 19, pp. 5057–68, Oct. 2002.
- [34] G. Cheng and J. D. Lambeth, “NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 6, pp. 4737–42, Feb. 2004.
- [35] G. Du *et al.*, “Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs.,” *J. Cell Biol.*, vol. 162, no. 2, pp. 305–15, Jul. 2003.
- [36] J. S. Lee *et al.*, “Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate specifically interacts with the phox homology domain of phospholipase D1 and stimulates its activity.,” *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 19, pp. 4405–13, Oct. 2005.
- [37] J. Xu, D. Liu, G. Gill, and Z. Songyang, “Regulation of cytokine-independent survival kinase (CISK) by the Phox homology domain and phosphoinositides.,” *J. Cell Biol.*, vol. 154, no. 4, pp. 699–705, Aug. 2001.
- [38] X. Song *et al.*, “Phox homology domains specifically bind phosphatidylinositol phosphates.,” *Biochemistry*, vol. 40, no. 30, pp. 8940–4, Jul. 2001.
- [39] F. Kanai *et al.*, “The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, no. 7, pp. 675–8, Jul. 2001.
- [40] C. P. Ponting, “Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains?,” *Protein Sci.*, vol. 5, no. 11, pp. 2353–7, Nov. 1996.
- [41] I. H. Jang *et al.*, “The Direct Interaction of Phospholipase C- γ 1 with Phospholipase D2 Is Important for Epidermal Growth Factor Signaling,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 20, pp. 18184–18190, May 2003.
- [42] Y. Niu *et al.*, “Ablation of SNX6 leads to defects in synaptic function of CA1 pyramidal neurons and spatial memory,” *Elife*, vol. 6, no. 4, pp. 1–41, Jan. 2017.
- [43] Y. Sun, A. C. Hedman, X. Tan, N. J. Schill, and R. A. Anderson, “Endosomal type I γ PIP 5-kinase controls EGF receptor lysosomal sorting.,” *Dev. Cell*, vol. 25, no. 2, pp.

144–55, Apr. 2013.

- [44] B. J. Mayer, M. Hamaguchi, and H. Hanafusa, “A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C,” *Nature*, vol. 332, no. 6161, pp. 272–275, Mar. 1988.
- [45] M. L. Stahl, C. R. Ferenz, K. L. Kelleher, R. W. Kriz, and J. L. Knopf, “Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src,” *Nature*, vol. 332, no. 6161, pp. 269–272, Mar. 1988.
- [46] H. Yu, M. Rosen, T. Shin, C. Seidel-Dugan, J. Brugge, and S. Schreiber, “Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site,” *Science (80-.)*, vol. 258, no. 5088, pp. 1665–1668, Dec. 1992.
- [47] A. Musacchio, M. Noble, R. Pauptit, R. Wierenga, and M. Saraste, “Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain,” *Nature*, vol. 359, no. 6398, pp. 851–5, Oct. 1992.
- [48] W. A. Lim, F. M. Richards, and R. O. Fox, “Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains,” *Nature*, vol. 372, no. 6504, pp. 375–379, Nov. 1994.
- [49] K. Saksela and P. Permi, “SH3 domain ligand binding: What’s the consensus and where’s the specificity?,” *FEBS Lett.*, vol. 586, no. 17, pp. 2609–14, Aug. 2012.
- [50] S. Feng, J. Chen, H. Yu, J. Simon, and S. Schreiber, “Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions,” *Science (80-.)*, vol. 266, no. 5188, pp. 1241–1247, Nov. 1994.
- [51] E. Manser *et al.*, “PAK Kinases Are Directly Coupled to the PIX Family of Nucleotide Exchange Factors,” *Mol. Cell*, vol. 1, no. 2, pp. 183–192, Jan. 1998.
- [52] A. M. Mongioli, “A novel peptide-SH3 interaction,” *EMBO J.*, vol. 18, no. 19, pp. 5300–5309, Oct. 1999.
- [53] M. Nishida, “Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains,” *EMBO J.*, vol. 20, no. 12, pp. 2995–3007, Jun. 2001.
- [54] P. Barnett, “The peroxisomal membrane protein Pex13p shows a novel mode of SH3 interaction,” *EMBO J.*, vol. 19, no. 23, pp. 6382–6391, Dec. 2000.
- [55] H. Kang, “SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based

- RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55,” *EMBO J.*, vol. 19, no. 12, pp. 2889–2899, Jun. 2000.
- [56] K. Koprivanacz *et al.*, “The SH3 domain of Caskin1 binds to lysophosphatidic acid suggesting a direct role for the lipid in intracellular signaling,” *Cell. Signal.*, vol. 32, pp. 66–75, Apr. 2017.
 - [57] Y. Groemping, K. Lapouge, S. J. Smerdon, and K. Rittinger, “Molecular Basis of Phosphorylation-Induced Activation of the NADPH Oxidase,” *Cell*, vol. 113, no. 3, pp. 343–355, May 2003.
 - [58] W. Xu, S. C. Harrison, and M. J. Eck, “Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src,” *Nature*, vol. 385, no. 6617, pp. 595–602, Feb. 1997.
 - [59] F. Sicheri, I. Moarefi, and J. Kuriyan, “Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck,” *Nature*, vol. 385, no. 6617, pp. 602–609, Feb. 1997.
 - [60] Z. Tatárová, J. Brábek, D. Rösel, and M. Novotný, “SH3 Domain Tyrosine Phosphorylation – Sites, Role and Evolution,” *PLoS One*, vol. 7, no. 5, p. e36310, May 2012.
 - [61] E. Solomaha, F. L. Szeto, M. A. Yousef, and H. C. Palfrey, “Kinetics of Src Homology 3 Domain Association with the Proline-rich Domain of Dynamins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 24, pp. 23147–23156, Jun. 2005.
 - [62] Y. Wu, S. D. Spencer, and L. A. Lasky, “Tyrosine Phosphorylation Regulates the SH3-mediated Binding of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein to PSTPIP, a Cytoskeletal-associated Protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 10, pp. 5765–5770, Mar. 1998.
 - [63] S. Pesti *et al.*, “Complex formation of EphB1/Nck/Caskin1 leads to tyrosine phosphorylation and structural changes of the Caskin1 SH3 domain,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 10, no. 1, p. 36, 2012.
 - [64] C. L. Abram *et al.*, “The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 19, pp. 16844–51, May 2003.
 - [65] M. Mao *et al.*, “The podosomal-adaptor protein SH3PXD2B is essential for normal postnatal development,” *Mamm. Genome*, vol. 20, no. 8, pp. 462–75, Aug. 2009.

- [66] A. C. Rufer, J. Rumpf, M. von Holleben, S. Beer, K. Rittinger, and Y. Groemping, "Isoform-Selective Interaction of the Adaptor Protein Tks5/FISH with Sos1 and Dynamins," *J. Mol. Biol.*, vol. 390, no. 5, pp. 939–950, Jul. 2009.
- [67] P. Saini and S. A. Courtneidge, "Tks adaptor proteins at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 131, no. 1, p. jcs203661, Jan. 2018.
- [68] M. Gimona, R. Buccione, S. A. Courtneidge, and S. Linder, "Assembly and biological role of podosomes and invadopodia," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 235–241, Apr. 2008.
- [69] S. Linder, "Invadosomes at a glance.," *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. Pt 17, pp. 3009–13, Sep. 2009.
- [70] S. Linder, "The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation.," *Trends Cell Biol.*, vol. 17, no. 3, pp. 107–17, Mar. 2007.
- [71] S. Linder and P. Kopp, "Podosomes at a glance.," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 10, pp. 2079–82, May 2005.
- [72] A. Gatesman, V. G. Walker, J. M. Baisden, S. A. Weed, and D. C. Flynn, "Protein kinase Calpha activates c-Src and induces podosome formation via AFAP-110.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 17, pp. 7578–97, Sep. 2004.
- [73] C. Varon *et al.*, "Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 9, pp. 3582–94, May 2006.
- [74] H. Yamaguchi and J. Condeelis, "Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1773, no. 5, pp. 642–652, May 2007.
- [75] L. R. Boateng and A. Huttenlocher, "Spatiotemporal regulation of Src and its substrates at invadosomes.," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 91, no. 11–12, pp. 878–88, 2012.
- [76] L. C. Cantley, "The phosphoinositide 3-kinase pathway.," *Science*, vol. 296, no. 5573, pp. 1655–7, May 2002.
- [77] T. Oikawa, T. Itoh, and T. Takenawa, "Sequential signals toward podosome formation

- in NIH-src cells.,” *J. Cell Biol.*, vol. 182, no. 1, pp. 157–69, Jul. 2008.
- [78] D. A. Murphy and S. A. Courtneidge, “The ‘ins’ and ‘outs’ of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, no. 7, pp. 413–426, Jul. 2011.
- [79] A. M. Weaver, “Regulation of cancer invasion by reactive oxygen species and Tks family scaffold proteins.,” *Sci. Signal.*, vol. 2, no. 88, p. pe56, Sep. 2009.
- [80] W.-S. Wu, “The signaling mechanism of ROS in tumor progression.,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 25, no. 4, pp. 695–705, Dec. 2006.
- [81] J. Mitsushita, J. D. Lambeth, and T. Kamata, “The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation.,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 10, pp. 3580–5, May 2004.
- [82] D. Gianni, B. Bohl, S. A. Courtneidge, and G. M. Bokoch, “The Involvement of the Tyrosine Kinase c-Src in the Regulation of Reactive Oxygen Species Generation Mediated by NADPH Oxidase-1,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 19, no. 7, pp. 2984–2994, Jul. 2008.
- [83] J. D. Lambeth, “NOX enzymes and the biology of reactive oxygen,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 3, pp. 181–189, 2004.
- [84] J. D. Lambeth, T. Kawahara, and B. Diebold, “Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression.,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 3, pp. 319–31, Aug. 2007.
- [85] A. W. Segal and O. T. Jones, “Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes.,” *Nature*, vol. 276, no. 5687, pp. 515–7, Nov. 1978.
- [86] A. Segal, O. . Jones, D. Webster, and A. Allison, “ABSENCE OF A NEWLY DESCRIBED CYTOCHROME b FROM NEUTROPHILS OF PATIENTS WITH CHRONIC GRANULOMATOUS DISEASE,” *Lancet*, vol. 312, no. 8087, pp. 446–449, Aug. 1978.
- [87] B. D. Volpp, W. M. Nauseef, and R. A. Clark, “Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease.,” *Science*, vol. 242, no. 4883, pp. 1295–7, Dec. 1988.

- [88] F. B. Wientjes, J. J. Hsuan, N. F. Totty, and A. W. Segal, "p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains.," *Biochem. J.*, vol. 296 (Pt 3, pp. 557–61, Dec. 1993.
- [89] C. a Parkos, M. C. Dinanuer, L. E. Walker, R. a Allen, a J. Jesaitis, and S. H. Orkin, "Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no. 10, pp. 3319–23, May 1988.
- [90] P. L. Hordijk, "Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins.," *Circ. Res.*, vol. 98, no. 4, pp. 453–62, Mar. 2006.
- [91] K. Bedard and K.-H. Krause, "The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology," *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 1, pp. 245–313, Jan. 2007.
- [92] T. Kawahara and J. D. Lambeth, "Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes.," *BMC Evol. Biol.*, vol. 7, p. 178, Sep. 2007.
- [93] B. Diaz, G. Shani, I. Pass, D. Anderson, M. Quintavalle, and S. A. Courtneidge, "Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation.," *Sci. Signal.*, vol. 2, no. 88, p. ra53, Sep. 2009.
- [94] L. S. Terada, "Specificity in reactive oxidant signaling: think globally, act locally.," *J. Cell Biol.*, vol. 174, no. 5, pp. 615–23, Aug. 2006.
- [95] R. F. Wu, Y. C. Xu, Z. Ma, F. E. Nwariaku, G. A. Sarosi, and L. S. Terada, "Subcellular targeting of oxidants during endothelial cell migration.," *J. Cell Biol.*, vol. 171, no. 5, pp. 893–904, Dec. 2005.
- [96] B. Yang *et al.*, "Sh3pxd2b mice are a model for craniofacial dysmorphology and otitis media.," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, p. e22622, 2011.
- [97] M. Mao *et al.*, "Localization of SH3PXD2B in human eyes and detection of rare variants in patients with anterior segment diseases and glaucoma.," *Mol. Vis.*, vol. 18, no. January, pp. 705–13, 2012.
- [98] M. Mao, A. Hedberg-Buenz, D. Koehn, S. W. M. John, and M. G. Anderson, "Anterior segment dysgenesis and early-onset glaucoma in nee mice with mutation of

- Sh3pxd2b,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 52, no. 5, pp. 2679–88, Apr. 2011.
- [99] Y. Frank *et al.*, “Megalocornea associated with multiple skeletal anomalies: a new genetic syndrome?,” *J. Genet. Hum.*, vol. 21, no. 2, pp. 67–72, Jun. 1973.
- [100] B. ter Haar, B. Hamel, J. Hendriks, and J. de Jager, “Melnick-Needles syndrome: indication for an autosomal recessive form,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 13, no. 4, pp. 469–77, Dec. 1982.
- [101] S. M. Maas, H. Kayserili, J. Lam, M. Y. Apak, and R. C. M. Hennekam, “Further delineation of Frank-ter Haar syndrome,” *Am. J. Med. Genet. A*, vol. 131, no. 2, pp. 127–133, Dec. 2004.
- [102] C. Borrone, M. Di Rocco, F. Crovato, G. Camera, and C. Gambini, “New multisystemic disorder involving heart valves, skin, bones, and joints in two brothers,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 46, no. 2, pp. 228–34, Apr. 1993.
- [103] G. R. Wilson *et al.*, “Mutations in SH3PXD2B cause Borrone dermatocardio-skeletal syndrome,” *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 22, no. 6, pp. 741–7, Jun. 2014.
- [104] C. L. Bendon *et al.*, “Frank-ter Haar syndrome associated with sagittal craniosynostosis and raised intracranial pressure,” *BMC Med. Genet.*, vol. 13, p. 104, Nov. 2012.
- [105] B. C. J. Hamel *et al.*, “Autosomal recessive Melnick-Needles syndrome or ter Haar syndrome? Report of a patient and reappraisal of an earlier report,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 56, no. 3, pp. 312–6, Apr. 1995.
- [106] T. Billette de Villemeur, G. Bijaoui, P. Beauvais, and J. M. Richardet, “Bowen syndrome: congenital glaucoma, flexion contracture of fingers and facial dysmorphism without peroxisomal abnormalities,” *Eur. J. Pediatr.*, vol. 151, no. 2, pp. 146–7, Feb. 1992.
- [107] R. Wallerstein, C. I. Scott, and L. Nicholson, “Extended survival in a new case of ter Haar syndrome: further delineation of the syndrome,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 70, no. 3, pp. 267–72, Jun. 1997.
- [108] A. Mégarbané, K. Tomey, and G. Wakim, “Congenital glaucoma, limb deformities, skeletal dysplasia, and facial anomalies: report of another family,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 73, no. 1, pp. 67–71, Nov. 1997.

- [109] E. M. Rosser, N. P. Mann, C. M. Hall, and R. M. Winter, "Serpentine fibula syndrome: Expansion of the phenotype with three affected siblings," *Clinical Dysmorphology*, vol. 5, no. 2, pp. 105–113, 1996.
- [110] Z. Aktas *et al.*, "Congenital glaucoma as an ophthalmic manifestation of Frank-Ter Haar syndrome.," *Int. Ophthalmol.*, vol. 34, no. 2, pp. 351–4, Apr. 2014.
- [111] P. Femitha, R. Joy, B. D. Gane, B. Adhisivam, and B. V. Bhat, "Frank-Ter Haar syndrome in a newborn.," *Indian J. Pediatr.*, vol. 79, no. 8, pp. 1091–3, Aug. 2012.
- [112] A. Zrhidri *et al.*, "Identification of two novel SH3PXD2B gene mutations in Frank-Ter Haar syndrome by exome sequencing: Case report and review of the literature.," *Gene*, vol. 628, pp. 190–193, Sep. 2017.
- [113] T. E. Köse, C. İşler, Ş. N. Şenel, T. Şitilci, İ. Özcan, and N. Aksakallı, "Frank-ter Haar syndrome--additional findings?," *Dentomaxillofac. Radiol.*, vol. 45, no. 2, p. 20150119, 2016.
- [114] B. E. Tuch, "Stem cells--a clinical update.," *Aust. Fam. Physician*, vol. 35, no. 9, pp. 719–21, Sep. 2006.
- [115] J. Rossant, "Stem cells from the Mammalian blastocyst.," *Stem Cells*, vol. 19, no. 6, pp. 477–82, 2001.
- [116] K. G. Sylvester, "Stem Cells," *Arch. Surg.*, vol. 139, no. 1, p. 93, Jan. 2004.
- [117] K. Takahashi *et al.*, "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.," *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861–72, Nov. 2007.
- [118] H. K. Salem and C. Thiemermann, "Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status," *Stem Cells*, vol. 28, no. 3, pp. 585–596, 2010.
- [119] R. J. Deans and A. B. Moseley, "Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses.," *Exp. Hematol.*, vol. 28, no. 8, pp. 875–84, Aug. 2000.
- [120] A. J. Friedenstein, K. V Petrakova, A. I. Kurolesova, and G. P. Frolova, "Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.," *Transplantation*, vol. 6, no. 2, pp. 230–47, Mar. 1968.
- [121] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, and K. S. Lalykina, "The development of

- fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.,” *Cell Tissue Kinet.*, vol. 3, no. 4, pp. 393–403, Oct. 1970.
- [122] Y. Kuroda and M. Dezawa, “Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine.,” *Anat. Rec. (Hoboken)*, vol. 297, no. 1, pp. 98–110, Jan. 2014.
- [123] D. G. Phinney and D. J. Prockop, “Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views.,” *Stem Cells*, vol. 25, no. 11, pp. 2896–902, Nov. 2007.
- [124] M. Dominici *et al.*, “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement,” *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, 2006.
- [125] T. Squillaro, G. Peluso, and U. Galderisi, “Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update.,” *Cell Transplant.*, vol. 25, no. 5, pp. 829–48, 2016.
- [126] M. M. Lalu *et al.*, “Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e47559, 2012.
- [127] S. Wang, X. Qu, and R. C. Zhao, “Clinical applications of mesenchymal stem cells.,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 5, no. 1, p. 19, Apr. 2012.
- [128] D. J. Prockop, “The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells.,” *Cytotherapy*, vol. 19, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [129] G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, and J. Middleton, “Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing.,” *Stem Cells*, vol. 25, no. 11, pp. 2739–49, Nov. 2007.
- [130] J. Wang, L. Liao, and J. Tan, “Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions.,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 11, no. 7, pp. 893–909, Jul. 2011.
- [131] S. Ma, N. Xie, W. Li, B. Yuan, Y. Shi, and Y. Wang, “Immunobiology of mesenchymal stem cells.,” *Cell Death Differ.*, vol. 21, no. 2, pp. 216–25, Feb. 2014.

- [132] R. A. Mitchell, R. B. Luwor, and A. W. Burgess, “Epidermal growth factor receptor: Structure-function informing the design of anticancer therapeutics,” *Exp. Cell Res.*, vol. 371, no. 1, pp. 1–19, Oct. 2018.
- [133] T. P. J. Garrett *et al.*, “Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha,” *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 763–73, Sep. 2002.
- [134] A. Appert-Collin, P. Hubert, G. Crémel, and A. Bennisroune, “Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion,” *Front. Pharmacol.*, vol. 6, no. NOV, p. 283, 2015.
- [135] M. R. Schneider and E. Wolf, “The epidermal growth factor receptor ligands at a glance,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 218, no. 3, pp. 460–6, Mar. 2009.
- [136] I. Pinilla-Macua, A. Grassart, U. Duvvuri, S. C. Watkins, and A. Sorkin, “EGF receptor signaling, phosphorylation, ubiquitylation and endocytosis in tumors in vivo,” *Elife*, vol. 6, pp. 1–25, 2017.
- [137] D. M. Freed, D. Alvarado, and M. A. Lemmon, “Ligand regulation of a constitutively dimeric EGF receptor,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, p. 7380, Dec. 2015.
- [138] M. a Olayioye, R. M. Neve, H. a Lane, and N. E. Hynes, “The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer,” *EMBO J.*, vol. 19, no. 13, pp. 3159–67, Jul. 2000.
- [139] W. Lilleby, F. Solca, and K. Røe, “Radiotherapy and inhibition of the EGF family as treatment strategies for prostate cancer: combining theragnostics with theragates,” *Oncol. Rev.*, vol. 5, no. 2, pp. 119–128, Jun. 2011.
- [140] A. Riesco, B. Santos-Buitrago, J. De Las Rivas, M. Knapp, G. Santos-García, and C. Talcott, “Epidermal Growth Factor Signaling towards Proliferation: Modeling and Logic Inference Using Forward and Backward Search,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, pp. 1–11, 2017.
- [141] M. Scaltriti and J. Baselga, “The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 18, pp. 5268–72, Sep. 2006.
- [142] P. Wee and Z. Wang, “Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling

- Pathways.,” *Cancers (Basel)*, vol. 9, no. 5, pp. 1–45, May 2017.
- [143] D. K. Luttrell, L. M. Luttrell, and S. J. Parsons, “Augmented mitogenic responsiveness to epidermal growth factor in murine fibroblasts that overexpress pp60c-src.,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 497–501, Jan. 1988.
- [144] M. C. Maa, T. H. Leu, D. J. McCarley, R. C. Schatzman, and S. J. Parsons, “Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 15, pp. 6981–5, Jul. 1995.
- [145] Z. Chen *et al.*, “EGFR family and Src family kinase interactions: mechanics matters?,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 51, pp. 97–102, Apr. 2018.
- [146] K. M. Quesnelle, A. L. Boehm, and J. R. Grandis, “STAT-mediated EGFR signaling in cancer.,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 102, no. 2, pp. 311–9, Oct. 2007.
- [147] K.-I. Sato, “Cellular functions regulated by phosphorylation of EGFR on Tyr845.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 6, pp. 10761–90, May 2013.
- [148] R. Roskoski, “Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors.,” *Pharmacol. Res.*, vol. 94, pp. 9–25, Apr. 2015.
- [149] M. C. Frame and R. Roskoski, “Src Family Tyrosine Kinases,” in *Reference Module in Life Sciences*, vol. 530, no. May 2016, Elsevier, 2017, pp. 548–549.
- [150] P. K. Vogt, “Retroviral oncogenes: a historical primer.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 9, pp. 639–48, 2012.
- [151] M. T. Brown and J. A. Cooper, “Regulation, substrates and functions of src.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1287, no. 2–3, pp. 121–149, Jun. 1996.
- [152] E. C. Gaffarogullari *et al.*, “A myristoyl/phosphoserine switch controls cAMP-dependent protein kinase association to membranes.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 411, no. 4, pp. 823–36, Aug. 2011.
- [153] O. Hantschel *et al.*, “A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl.,” *Cell*, vol. 112, no. 6, pp. 845–57, Mar. 2003.
- [154] J. Homsí, C. Cubitt, and A. Daud, “The Src signaling pathway: a potential target in

- melanoma and other malignancies.,” *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 11, no. 1, pp. 91–100, Jan. 2007.
- [155] R. Roskoski, “Src protein-tyrosine kinase structure and regulation.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 324, no. 4, pp. 1155–1164, Nov. 2004.
- [156] X. M. Zheng, R. J. Resnick, and D. Shalloway, “A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha.,” *EMBO J.*, vol. 19, no. 5, pp. 964–78, Mar. 2000.
- [157] M. C. Frame, “Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1602, no. 2, pp. 114–30, Jun. 2002.
- [158] S. C. Harrison, “Variation on an Src-like theme.,” *Cell*, vol. 112, no. 6, pp. 737–40, Mar. 2003.
- [159] R. Roskoski, “Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 331, no. 1, pp. 1–14, May 2005.
- [160] S. J. Parsons and J. T. Parsons, “Src family kinases, key regulators of signal transduction.,” *Oncogene*, vol. 23, no. 48, pp. 7906–9, Oct. 2004.
- [161] F. Cattaneo *et al.*, “Cell-surface receptors transactivation mediated by g protein-coupled receptors.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 11, pp. 19700–28, Oct. 2014.
- [162] J. T. Parsons, “Focal adhesion kinase: the first ten years.,” *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. Pt 8, pp. 1409–16, Apr. 2003.
- [163] K. Burridge and M. Chrzanowska-Wodnicka, “Focal adhesions, contractility, and signaling.,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 463–518, 1996.
- [164] L. V Owens *et al.*, “Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors.,” *Cancer Res.*, vol. 55, no. 13, pp. 2752–5, Jul. 1995.
- [165] D. D. Schlaepfer and S. K. Mitra, “Multiple connections link FAK to cell motility and invasion.,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 14, no. 1, pp. 92–101, Feb. 2004.
- [166] R. Ishizawar and S. J. Parsons, “c-Src and cooperating partners in human cancer.,” *Cancer Cell*, vol. 6, no. 3, pp. 209–14, Sep. 2004.

- [167] M. J. Deutsch, S. C. Schriever, A. A. Roscher, and R. Ensenuer, “Digital image analysis approach for lipid droplet size quantitation of Oil Red O-stained cultured cells.,” *Anal. Biochem.*, vol. 445, no. 1, pp. 87–9, Jan. 2014.
- [168] Z. Dosztányi, V. Csizmok, P. Tompa, and I. Simon, “IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content.,” *Bioinformatics*, vol. 21, no. 16, pp. 3433–3434, Aug. 2005.
- [169] H. Dinkel *et al.*, “The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. Database issue, pp. D259-266, Jan. 2014.
- [170] S. Penel *et al.*, “Databases of homologous gene families for comparative genomics.,” *BMC Bioinformatics*, vol. 10 Suppl 6, p. S3, Jun. 2009.
- [171] R. C. Edgar, “MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity.,” *BMC Bioinformatics*, vol. 5, p. 113, Aug. 2004.
- [172] G. E. Crooks, G. Hon, J.-M. Chandonia, and S. E. Brenner, “WebLogo: a sequence logo generator.,” *Genome Res.*, vol. 14, no. 6, pp. 1188–1190, Jun. 2004.
- [173] S. Feng, C. Kasahara, R. J. Rickles, and S. L. Schreiber, “Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 26, pp. 12408–12415, Dec. 1995.
- [174] B. a Lynch, K. a Loiacono, C. L. Tiong, S. E. Adams, and I. a MacNeil, “A fluorescence polarization based Src-SH2 binding assay.,” *Anal. Biochem.*, vol. 247, no. 1, pp. 77–82, Apr. 1997.
- [175] B. Hegyi *et al.*, “Regulation of mouse microglia activation and effector functions by bone marrow-derived mesenchymal stem cells.,” *Stem Cells Dev.*, vol. 23, no. 21, pp. 2600–12, Nov. 2014.
- [176] G. J. Szebeni *et al.*, “Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stromal cell-mediated tumor promotion.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e41372, 2012.
- [177] A. Peister, J. A. Mellad, B. L. Larson, B. M. Hall, L. F. Gibson, and D. J. Prockop, “Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential.,”

- Blood*, vol. 103, no. 5, pp. 1662–8, Mar. 2004.
- [178] N. Eliopoulos, J. Stagg, L. Lejeune, S. Pommey, and J. Galipeau, “Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice.,” *Blood*, vol. 106, no. 13, pp. 4057–65, Dec. 2005.
 - [179] Y. Shi, Y.-Y. Xia, L. Wang, R. Liu, K.-S. Khoo, and Z.-W. Feng, “Neural cell adhesion molecule modulates mesenchymal stromal cell migration via activation of MAPK/ERK signaling.,” *Exp. Cell Res.*, vol. 318, no. 17, pp. 2257–67, Oct. 2012.
 - [180] C. Zhang, “Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*.,” *J. Orthop. Surg. Res.*, vol. 5, no. 1, p. 37, Jun. 2010.
 - [181] J. Xu, Z. Li, Y. Hou, and W. Fang, “Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells.,” *Am. J. Transl. Res.*, vol. 7, no. 12, pp. 2527–35, 2015.
 - [182] Z. Liu *et al.*, “Mediator MED23 cooperates with RUNX2 to drive osteoblast differentiation and bone development.,” *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 11149, Apr. 2016.
 - [183] M. J. Ortuño *et al.*, “p38 regulates expression of osteoblast-specific genes by phosphorylation of osterix.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 42, pp. 31985–94, Oct. 2010.
 - [184] M. Lehrke and M. A. Lazar, “The many faces of PPARgamma.,” *Cell*, vol. 123, no. 6, pp. 993–9, Dec. 2005.
 - [185] E. Martella, C. Bellotti, B. Dozza, S. Perrone, D. Donati, and E. Lucarelli, “Secreted adiponectin as a marker to evaluate in vitro the adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells.,” *Cytotherapy*, vol. 16, no. 11, pp. 1476–1485, Nov. 2014.
 - [186] P. Li *et al.*, “Clk/STY (cdc2-like kinase 1) and Akt regulate alternative splicing and adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 1, p. e53268, 2013.
 - [187] R. Gruber, D. D. Bosshardt, R. J. Miron, A. C. Gemperli, D. Buser, and A. Sculean, “Enamel matrix derivative inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells via activation of TGF- β RI kinase activity.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e71046, 2013.
 - [188] Y. Walczak *et al.*, “Expression profiling of microglia and macrophages using novel lipidomic TaqMan® array cards and TaqMan array plates,” *Biotechniques*, vol. 46, no.

- 4, pp. 315–317, 2009.
- [189] D. Gianni, N. Taulet, C. DerMardirossian, and G. M. Bokoch, “c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 23, pp. 4287–4298, Dec. 2010.
 - [190] A. B. Reynolds *et al.*, “SRChing for the substrates of Src,” *Oncogene*, vol. 33, no. 37, pp. 4537–4547, Sep. 2014.
 - [191] T. J. Boggon and M. J. Eck, “Structure and regulation of Src family kinases,” *Oncogene*, vol. 23, no. 48, pp. 7918–7927, Oct. 2004.
 - [192] H. Okamura and M. D. Resh, “p80/85 cortactin associates with the Src SH2 domain and colocalizes with v-Src in transformed cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 44, pp. 26613–26618, Nov. 1995.
 - [193] S. Sachdev, Y. Bu, and I. H. Gelman, “Paxillin-Y118 phosphorylation contributes to the control of Src-induced anchorage-independent growth by FAK and adhesion,” *BMC Cancer*, vol. 9, p. 12, Jan. 2009.
 - [194] B. Han *et al.*, “Conversion of mechanical force into biochemical signaling,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 52, pp. 54793–54801, Dec. 2004.
 - [195] T. Nakamoto, R. Sakai, K. Ozawa, Y. Yazaki, and H. Hirai, “Direct binding of C-terminal region of p130Cas to SH2 and SH3 domains of Src kinase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 15, pp. 8959–8965, Apr. 1996.
 - [196] J. W. Thomas, B. Ellis, R. J. Boerner, W. B. Knight, G. C. White, and M. D. Schaller, “SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 1, pp. 577–583, Jan. 1998.
 - [197] S. J. Taylor and D. Shalloway, “An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis,” *Nature*, vol. 368, no. 6474, pp. 867–871, Apr. 1994.
 - [198] K. Alexandropoulos and D. Baltimore, “Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel p130Cas-related protein, Sin,” *Genes Dev.*, vol. 10, no. 11, pp. 1341–1355, Jun. 1996.

- [199] R. H. Kramer and J. W. Karpen, "Spanning binding sites on allosteric proteins with polymer-linked ligand dimers.," *Nature*, vol. 395, no. 6703, pp. 710–713, Oct. 1998.
- [200] A. Fekete, G. Bögel, S. Pesti, Z. Péterfi, M. Geiszt, and L. Buday, "EGF regulates tyrosine phosphorylation and membrane-translocation of the scaffold protein Tks5.," *J. Mol. Signal.*, vol. 8, p. 8, 2013.
- [201] R. P. T. Somerville, S. A. Oblander, and S. S. Apte, "Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks.," *Genome Biol.*, vol. 4, no. 6, p. 216, 2003.
- [202] M. Bonyadi, S. D. Waldman, D. Liu, J. E. Aubin, M. D. Grynepas, and W. L. Stanford, "Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 10, pp. 5840–5, May 2003.
- [203] T. Komori, "Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2.," *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 189–95, Jan. 2010.
- [204] K. Nakashima *et al.*, "The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.," *Cell*, vol. 108, no. 1, pp. 17–29, Jan. 2002.
- [205] H. E. Lindfors, B. S. Venkata, J. W. Drijfhout, and M. Ubbink, "Linker length dependent binding of a focal adhesion kinase derived peptide to the Src SH3-SH2 domains.," *FEBS Lett.*, vol. 585, no. 4, pp. 601–605, Feb. 2011.
- [206] E. Kim *et al.*, "Crosstalk between Src and major vault protein in epidermal growth factor-dependent cell signalling.," *FEBS J.*, vol. 273, no. 4, pp. 793–804, Feb. 2006.
- [207] B. Y. Chang, M. Chiang, and C. A. Cartwright, "The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 23, pp. 20346–20356, Jun. 2001.
- [208] A. P. Belsches, M. D. Haskell, and S. J. Parsons, "Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis.," *Front. Biosci.*, vol. 2, no. 804, pp. d501-518, Oct. 1997.
- [209] G. Alonso, M. Koegl, N. Mazurenko, and S. A. Courtneidge, "Sequence requirements for binding of Src family tyrosine kinases to activated growth factor receptors.," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 17, pp. 9840–9848, Apr. 1995.

- [210] P. A. Bromann, H. Korkaya, and S. A. Courtneidge, "The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases.," *Oncogene*, vol. 23, no. 48, pp. 7957–7968, Oct. 2004.
- [211] D. J. Sieg, C. R. Hauck, and D. D. Schlaepfer, "Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration.," *J. Cell Sci.*, vol. 112 (Pt 1, pp. 2677–2691, Aug. 1999.
- [212] S. B. Kanner, A. B. Reynolds, H. C. Wang, R. R. Vines, and J. T. Parsons, "The SH2 and SH3 domains of pp60src direct stable association with tyrosine phosphorylated proteins p130 and p110.," *EMBO J.*, vol. 10, no. 7, pp. 1689–1698, Jul. 1991.
- [213] M. R. Burnham *et al.*, "Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 16, pp. 5865–5878, Aug. 2000.
- [214] S. T. Arold *et al.*, "The role of the Src homology 3-Src homology 2 interface in the regulation of Src kinases.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 20, pp. 17199–17205, May 2001.
- [215] E. Ingley, "Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1784, no. 1, pp. 56–65, Jan. 2008.
- [216] P. Pellicena and W. T. Miller, "Processive phosphorylation of p130Cas by Src depends on SH3-polyproline interactions.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 30, pp. 28190–28196, Jul. 2001.
- [217] J. A. Head *et al.*, "Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 14, no. 8, pp. 3216–3229, Aug. 2003.
- [218] R. J. Daly, "Cortactin signalling and dynamic actin networks.," *Biochem. J.*, vol. 382, no. Pt 1, pp. 13–25, Aug. 2004.
- [219] E. Ingley *et al.*, "Csk-binding protein mediates sequential enzymatic down-regulation and degradation of Lyn in erythropoietin-stimulated cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 42, pp. 31920–31929, Oct. 2006.
- [220] I. Moarefi *et al.*, "Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement.," *Nature*, vol. 385, no. 6617, pp. 650–653, Feb. 1997.

- [221] M. LaFevre-Bernt, F. Sicheri, A. Pico, M. Porter, J. Kuriyan, and W. T. Miller, "Intramolecular regulatory interactions in the Src family kinase Hck probed by mutagenesis of a conserved tryptophan residue.," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 48, pp. 32129–32134, Nov. 1998.

12 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

- **Dülk, M. ***, Kudlik, G. *, Fekete, A., Ernszt, D., Kvell, K., Pongrácz, J. E., Merő, B. L., Szeder, B., Radnai, L., Geiszt, M., Csécsy, D. E., Kovács, T., Uher, F., Lányi, Á., Vas, V., and Buday, L. (2016) *The scaffold protein Tks4 is required for the differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) into adipogenic and osteogenic lineages*. Sci. Rep. 6, 34280 / * megosztott elsőszervezők/
- **Dülk, M.**, Szeder, B., Glatz, G., Merő, B. L., Koprivanacz, K., Kudlik, G., Vas, V., Sipeki, S., Cserkaszký, A., Radnai, L., and Buday, L. (2018) *EGF Regulates the Interaction of Tks4 with Src through Its SH2 and SH3 Domains*. Biochemistry. 57, 4186–4196

A disszertációtól független publikációk:

- Merő, B., Radnai, L., Gógl, G., Tőke, O., Leveles, I., Koprivanacz, K., Szeder, B., **Dülk, M.**, Kudlik, G., Vas, V., Cserkaszký, A., Sipeki, S., Nyitray, L., Vértessy, B. G., Buday, L. (2019) *Structural insights into the tyrosine phosphorylation-mediated inhibition of SH3 domain-ligand interactions*. J Biol Chem

13 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Buday Lászlónak, hogy helyet biztosított az MTA TTK Enzimológiai Intézetben és lehetővé tette, hogy PhD munkámat laboratóriumában végezhessem. Külön köszönöm támogatását, értékes tanácsait és tapasztalatait, melyeket megosztott velem.

Köszönöm Dr. Erdei Annának és Dr. Kovács Mihálynak, hogy tanulmányaimat a Biológia Doktori Iskola Szerkezeti Biokémia Programjában végezhettem el.

Külön köszönettel tartozom munkatársaimnak, Dr. Vas Virágnak és Dr. Radnai Lászlónak, hogy bekapcsolódhattam az általuk indított vizsgálatokba, és sok segítséget nyújtottak a laboratóriumi munkámhoz.

Köszönöm az SE Orvosi Vegytani Intézetben dolgozó Dr. Bögel Gábornak, hogy a dolgozatban bemutatott technikák egy részét elsajátíthattam tőle.

Köszönöm munkacsoportunk minden tagjának a vidám légkört, mely laborunk mindennapjait jellemzi. Nagyon sokat segítettek tanácsaikkal, ötleteikkel.

Köszönettel tartozom páromnak, hogy a PhD munkám és az értekezés elkészítésének hosszadalmas és nehéz időszaka alatt nyugodt körülményeket biztosított számomra és mindenben a segítségemre volt.

Végezetül hálával tartozom családomnak, elsősorban édesanyámnak, hogy egyetemi és PhD tanulmányaim alatt mindvégig támogatott és megteremtette a biztos hátteret számomra.

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Dülk Metta**

MTMT-azonosító: **10057969**

A doktori értekezés címe és alcíme: **A Tks4 állványfémérje funkcionális vizsgálata**

DOI-azonosító46: **10.15476/ELTE.2019.037**

A doktori iskola neve: **ELTE Biológia Doktori Iskola**

A doktori iskolán belüli doktori program neve: **Szerkezeti Biokémia Program**

A témavezető neve és tudományos fokozata: **Dr. Buday László, MTA levelező tagja**

A témavezető munkahelye: **MTA TTK Enzimológiai Intézet**

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (dátum)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: 2019.03.25.....

Dülk Metta.....

a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet